

LICHTABHÄNGIGE AKTIN - UND
TUBULINEXPRESSION IN
PHYSARUM POLYCEPHALUM

Anne Katrin Werenskiold

*Diss.
München
1985*

LICHTABHÄNGIGE AKTIN - UND TUBULINEXPRESSION

IN *PHYSARUM POLYCEPHALUM*

Dissertation

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Anne Katrin Werenskiold

München 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Winnacker

Datum der mündlichen Prüfung: 27.6.1985

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 1982 bis Mai 1985 unter der Anleitung von Dr. Th. Schreckenbach am Max - Planck - Institut für Biochemie durchgeführt.

Bedanken möchte ich mich bei C. Grauvogl für ihre engagierte Mitarbeit und endlose Ruhe,

bei Prof. Dr. G. Valet für die Durchführung der cytofluorimetrischen Untersuchungen,

bei B. Cox für die Betreuung meiner Arbeit am National Institute for Medical Research, Mill Hill, sowie bei der EMBO für die Vergabe eines Forschungsstipendiums,

und bei den Mitarbeitern der Gruppe für die sporadischen Versuche, absolutes Chaos zu verhindern.

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	3
2.1	Zelldifferenzierung und Genexpression	3
2.2	Die Cytoskelettproteine Aktin und Tubulin	6
2.3	Zielsetzung	9
3.	MATERIAL UND METHODEN	10
3.1	Materialien	10
3.1.1	Chemikalien	10
3.1.2	Enzyme	11
3.1.3	Sonstige Materialien	11
3.1.4	Organismen	11
3.1.5	Verwendete Plasmide	12
3.2	Kulturbedingungen	12
3.2.1	Medien für Physarum (Daniel & Baldwin, 1964)	12
3.2.2	Medien für E.coli	13
3.2.3	Züchtung von Plasmodien	13
3.3	In vivo Markierung und Extraktion von Plasmodienproteinen	14
3.4	Affinitätschromatographie an DNase 1 - Sepharose (Zechel, 1980)	15
3.5	RNA Isolierungen	15
3.5.1	Guanidiniumrhodanid-Extraktion (Chirgwin et al, 1979; Werenskiold, 1982)	15

3.5.2	Phenolextraktion (Melerá et al. 1978)	16
3.5.3	Anreicherung von PolyA-RNA durch Affinitätschromatographie (Palatnik, 1981)	17
3.5.4	Zellfreie Translation von RNA in Reticulocytenlysät	18
3.6	Proteintrennungsmethoden	19
3.6.1	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)	19
3.6.2	Zweidimensionale Elektrophorese in ultradünnen Gelen	20
3.7	Fluorographie	21
3.8	Isolierung von Zellkernen	22
3.8.1	In vitro Transkription in isolierten Kernen	23
3.8.2	Isolierung markierter Kern-RNA	23
3.9	Isolierung chromosomaler DNA aus Physarum	24
3.10	Isolierung von Plasmiden (Birnboim & Doly, 1979)	24
3.10.1	Minipräparation	24
3.10.2	Plasmidisolierung in großem Maßstab	25
3.11	Isolierung von Plasmidinserts	25
3.11.1	Elution aus Agarosegelen	26
3.11.2	Zentrifugation im neutralen Sucrosegradienten	27
3.12	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	27

3.12.1	Denaturierendes Formaldehyd- Agarosegel (Lehrach et al, 1977)	27
3.12.2	Nicht-denaturierende Agarosegele	28
3.13	Hybridisierung filtergebundener Nukleinsäuren	28
3.13.1	Transfer von RNA auf Nitrozellulose (Thomas.1983)	28
3.13.2	Transfer von DNA auf Nitrozellulose (Southern, 1975)	28
3.13.3	Bindung von Plasmid-DNA an Nitrozellulose (dot-blot)	29
3.13.4	Hybridisierung und Waschen der Filter	29
3.13.5	Radioaktive Markierung von DNA durch nick - Translation	30
3.14	EMBL 4 - Clonierung	31
3.14.1	Isolierung des Vektors EMBL4	31
3.14.2	Isolierung der Vektor DNA	32
3.14.3	Präparation der Vektor-Arme	32
3.14.4	Herstellung von 12 - 18kb Fragmenten chromosomaler DNA	32
3.14.5	Ligierung und in vitro packaging	33
3.14.6	Plattierung rekombinanter Phagen	34
3.14.7	Identifizierung rekombinanter Clone	35
3.15	Allgemein verwendete Reagenzien und Puffer	36
4.	ERGEBNISSE	38
4.1	Charakterisierung von Aktinvarianten in <i>Physarum</i> - Plasmodien	38
4.1.1	Inhibition der Aktinsynthese im Laufe	

der Sporulation	41
4.2 Transkription in isolierten Zellkernen	43
4.2.1 Isolierung von Zellkernen	43
4.2.2 Standardisierung der in vitro Transkriptionsbedingungen	44
4.2.3 Differenzierungsspezifische Änderungen der Transkriptionsaktivität isolierter Zellkerne	48
4.2.4 Isolierung in vitro transkribierter RNA	49
4.2.5 Nachweis der spezifischen Transkription Polymerase 2 - abhängiger Gene	49
4.3 Regulation der Aktin - und Tubulin mRNA Synthese	55
4.3.1 Zeitliche Regulation der Aktin - und Tubulin mRNA Konzentration	57
4.3.2 Transkription von Aktin und Tubulin in vitro	59
4.4 Clonierung genomischer Tubulinsequenzen aus <i>Physarum</i>	66
4.4.1 Konstruktion einer genomischen Genbank im λ - Phagen EMBL - 4	66
4.4.2 Isolierung tubulin - spezifischer Clone	67
4.4.3 Charakterisierung der rekombinanten Phagen $\lambda\alpha$ 43 und $\lambda\beta$ 40	67
4.4.4 Subclonierung und Charakterisierung des Fragments β 40 - 2	72
5. DISKUSSION	74
5.1 Identifizierung von Aktin	74

5.2	Kernisolierung und in vitro Transkription	74
5.3	Regulation der Aktin und Tubulin mRNA	76
5.3.1	Aktin	76
5.3.2	Tubulin	77
5.4	Clonierung genomischer Tubulinsequenzen aus <i>Physarum</i>	79
6.	ANHANG	82
7.	LITERATUR	85
8.	ABKÜRZUNGEN	91

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die lichtinduzierte Sporulation von *Physarum* Plasmodien stellt einen hochsynchronen Entwicklungsprozeß dar und ist daher ein geeignetes Modellsystem zum Studium signalabhängiger, differentieller Genexpression in Eukaryonten. In früheren Arbeiten (Putzer et al., 1984) wurde gezeigt, daß die Fruchtkörperbildung von der Induktion von mindestens 11 morphogenetischen Proteinen und von 56 mRNA - Spezies begleitet wird. Zwei der induzierten Proteine wurden als Tubuline identifiziert. Die Synthese eines 42 kD Plasmodienproteins wird während der lichtinduzierten Differenzierung inhibiert.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit sollte die Identität dieses 42 kD Proteins mit Aktin geprüft werden. Hierzu wurde die für Aktin charakteristische spezifische Bindung des 42kD Proteins an DNase 1 gezeigt. Nach anschließender isoelektrischer Fokussierung des mittels Affinitätschromatographie an DNase 1 - Sepharose isolierten Aktins wurden drei Isoformen mit isoelektrischen Punkten von 5,2 ; 5,3 und 5,6 unterschieden.

Für die im weiteren durchgeführten Untersuchungen zur Regulation der Aktin - und Tubulinsynthese wurde ein nukleäres Transkriptionssystem etabliert, das für die Untersuchung Polymerase 2 - abhängiger Gene geeignet ist. Die Aktivität der endogenen Polymerase 2 in isolierten Kernen zeigte während der Sporangienmorphogenese eine 50 %ige Steigerung. Die Quantifizierung spezifischer Transkripte (Aktin, Tubulin, rRNA) erfolgte durch dot - blot Hybridisierung.

Zur Analyse der Regulation der Aktin - und Tubulin mRNA

wurden Northern - blot Hybridisierungen und zellfreie Translation von Gesamt - RNA sowie Transkriptionsanalysen an isolierten Kernen verschiedener Differenzierungsstadien durchgeführt. Diese Untersuchungen belegten, daß die Inhibition der Aktinsynthese auf dem Verlust der 1.6 kb Aktin mRNA Sequenzen beruht. Der Nachweis der kontinuierlichen Transkription von Aktinsequenzen während der Differenzierung läßt auf einen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus schliessen.

Die Induktion der α - Tubulinsynthese korrelierte mit einer transienten Stimulierung der 1,9 kb Tubulin mRNA. Eine hiermit korrelierende deutliche Induktion der Tubulintranskription in isolierten Kernen wurde jedoch nicht beobachtet. Für die detaillierte Untersuchung der Tubulingenexpression war die Clonierung homologer genomischer Sequenzen erforderlich. Hierfür wurde eine Genbank im λ - Phagen EMBL 4 angelegt. Tubulinspezifische Clone wurden mittels Hybridisierung gegen eine homologe α - Tubulin und eine heterologe β - Tubulin cDNA identifiziert. Mit der Subclonierung und Charakterisierung der tubulinspezifischen Sequenzen wurde begonnen.

2. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

2.1 Zelldifferenzierung und Genexpression

Die verschiedenen Zelltypen eukaryontischer Organismen weisen morphologisch und funktionell große Unterschiede auf. Die Grundlage hierfür bildet die differentielle Regulation der Genexpression in Differenzierungsprozessen. Diese bewirkt eine Zelldisperspezifität der Expression individueller Gene (Gurdon et al., 1984) und führt so zu Unterschieden im Proteinspektrum der Zellen, die deren charakteristischen Funktionen entsprechen.

Der Schleimpilz *Physarum polycephalum* als Modellsystem zum Studium differentieller Genexpression

Der Myxomycet *Physarum polycephalum* besitzt zwei vegetative Lebensformen, einkernige Amöben und vielkernige Plasmodien. Plasmodien stellen einzellige Organismen dar, die zu einer Größe von mehreren cm Durchmesser heranwachsen können und dann etwa 10^8 Kerne enthalten. Die Kerne einer Zelle durchlaufen synchrone Mitosen mit einer Zellzyklusdauer von etwa 8 h. Unter ungünstigen Lebensbedingungen stehen dem Organismus zwei Differenzierungswege zur Verfügung, die zur Bildung von Dauerstadien führen. Beide Differenzierungsprozesse können unter Laborbedingungen nach Transfer der Plasmodien auf Hungermedium induziert werden. Im Dunkeln erfolgt die Sklerotisierung, ein reversibler Prozeß der Encystierung des Cytoplasmas. Durch Belichtung wird die Bildung von Fruchtkörpern (Sporangien) induziert. In diesem irreversiblen Differenzierungsprozeß entstehen nach

Durchlaufen meiotischer Teilungen haploide encystierte Sporen.

Lichtinduzierte Fruchtkörperbildung

Die Sporangienbildung wird nach viertägiger Inkubation der Plasmodien unter Hungerbedingungen durch Belichtung mit Weißlicht induziert. Wirksame Wellenlängen sind kurzwelliges UV - und Rotlicht. Die Natur des Photorezeptors ist unbekannt. Der Differenzierungsprozeß läßt sich in drei Stadien unterteilen :

- eine dreistündige Induktion durch Belichtung
- eine etwa siebenstündige Postinduktionsperiode
- die Phase der morphologischen Differenzierung. Sie beginnt etwa 10 Stunden nach Belichtungsbeginn mit der Einschnürung der Cytoplasmastränge und endet 10 Stunden später mit der Melanisierung der Fruchtkörper (Abb. 1).

Die Phase der Morphogenese ist biochemisch charakterisiert durch eine zeitlich hochkoordinierte Induktion einer Vielzahl sporulationsspezifischer m,RNA - Spezies und daraus resultierenden Veränderungen im Proteinstmuster (Putzer et al., 1984). Bei zweien der induzierten Proteine handelt es sich um Tubuline. Die Hemmung eines dominierenden 42kD Proteins wurde beobachtet: die Vermutung, daß es sich dabei um Aktin handelt, sollte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Von der Signalkette dieses Differenzierungsvorganges ist nur das auslösende Signal (ultraviolette und rotes Licht) und dessen späte Wirkung, die Induktion differenzierungsspezifischer Genprodukte, bekannt. Die Teilschritte der Signalübermittlung sind noch unverstanden. Die Identifizierung regulierter Genprodukte als Aktin und Tubulin bietet jedoch die Möglichkeit, in diesem hochsynchronen System die lichtabhängige Regulation der Expression dieser Gene genauer zu studieren.

Signalabhängige Genexpression

Ein allgemein akzeptiertes Grundkonzept der signalabhängigen Genexpression umfaßt die folgenden Teilschritte:

- die Induktion durch ein extrazelluläres Signal:

Signalwirkung besitzen in tierischen und pflanzlichen Organismen chemische Substanzen (Hormone), darüber hinaus wird in Pflanzen eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen durch Licht gesteuert.

- die intrazelluläre Signalübermittlung: sie kann entweder, wie im Falle der Steroidhormone, direkt durch den Komplex des Hormons mit dem cytoplasmatischen Rezeptor (Tata et al., 1983), oder, wie im Falle einiger Peptidhormone, über sekundäre Transmitter (cAMP) erfolgen.

- die Signalwirkung: sie umfasst alle nukleären und cytoplasmatischen Regulationsmechanismen der Genexpression und deren Manifestation in Veränderungen der Proteinsynthese. Dabei können bei der Expression eukaryontischer Gene die folgenden Prozesse einer Regulation unterliegen: die Transkription, die Prozessierung des Primärtranskripts, der Transport der mRNA in das Zytoplasma, die Translation der mRNA, sowie deren Abbau.

Die Untersuchung lichtabhängiger Signalketten in pflanzlichen Systemen ist heute weitgehend auf die phytochromabhängigen Differenzierungsprozesse höherer Pflanzen beschränkt. Hier konnte nach Belichtung die Induktion spezifischer mRNA Spezies (Apel, 1979) und eine Stimulation der Transkription des lichtinduzierten Enzyms Ribulose - Biphosphat - Carboxylase (Tobin, 1981) gezeigt werden. Mechanismen der phytochromunabhängigen Lichtregulation, wie bei der blaulichtabhängigen Fruchtkörperbildung bei Pilzen und der Chloroplastensynthese bei Algen und höheren Pflanzen (Senger, 1980) sind dagegen ungeklärt. Der Photorezeptor von *Physarum* ist nicht bekannt, gegen eine Identität mit Phyochrom spricht, daß dieser Rezeptor bislang ausschließlich in höheren Pflanzen nachgewiesen werden konnte.

Prinzipiell kann mit der Aufklärung einer Signalkette am Anfangs - oder am Endpunkt des Differenzierungsprozesses begonnen werden. So kann die Analyse entweder bei der primären Signalwirkung mit der Charakterisierung des

Photorezeptors beginnen oder rückwärts über die Charakterisierung der Genprodukte erfolgen. Eine wichtige Rolle bei diesem Ansatz spielen nukleäre *in vitro* Transkriptionssysteme, die eine Analyse der Regulation distinkter Gene ermöglichen. Die Untersuchung der Transkriptionsaktivität in intakten Zellkernen erfolgt an der weitgehend nativen Chromatinstruktur. Auch ist eine hohe spezifische Markierung der *in vitro* synthetisierten RNA durch Zugabe radioaktiv markierter Nukleosidtriphosphate möglich, die in intakten Zellen häufig durch die für diese Substanzen impermeable Zellmembran verhindert wird. Nukleäre Transkriptionssysteme ermöglichen Studien der Transkriptionsaktivität und deren Beeinflussung durch regulatorische Faktoren unter weitgehend nativen Bedingungen. So konnte z. B. eine phytochromabhängige Erhöhung der Transkriptionsaktivität nach *in vitro* Applikation aktiven Phytochroms an isolierten Kernen gezeigt werden (Ernst & Oesterheld, 1984).

Stehen geeignete clonierte Proben zur Verfügung, kann die Transkription individueller Gene analysiert werden. Ein Beispiel hierfür ist der Nachweis der Induktion der Tubulintranskription in isolierten Zellkernen aus deflagellierten *Chlamydomonas*-Zellen (Keller et al., 1984). Während differentielle Unterschiede in der Transkription individueller Gene in Kernen aus verschiedenen Zelltypen gezeigt werden konnten, steht der Nachweis der signalabhängigen Aktivierung eines Gens in einem nukleären System noch aus.

2.2 Die Cytoskelettproteine Aktin und Tubulin

Eukaryontische Zellen besitzen distinkte Formen und ein hochstrukturiertes Cytoplasma. Diese Eigenschaften, wie auch die Fähigkeit höherer Zellen ihre Form zu verändern und Organellen zu bewegen, beruhen auf einem komplexen Netzwerk

von Proteinfilamenten, dem Cytoskelett. Dessen wesentlichste Strukturelemente sind die Aktin enthaltenden Mikrofilamente und die Tubulin enthaltenden Mikrotubuli. Beide bestehen aus globulären Proteinuntereinheiten, die reversibel polymerisieren können. Aktin und Tubuline sind in eukaryontischen Organismen ubiquitär vorhandenen Proteine und sind in ihrer Struktur hochkonserviert (Vandekerckhove & Weber, 1978, Cleveland, 1983).

Aktin

Mit einem Anteil von bis zu 20% am Gesamtprotein der Zelle ist Aktin das wichtigste Strukturprotein. Neben seiner Rolle in der Muskelkontraktion erfüllt Aktin auch in Nichtmuskelzellen entscheidende Funktionen für die Struktur des Cytoskeletts. Vorgänge der Zellbewegung und Plasmaströmung (Korn, 1978; Pollard & Weihing, 1974). *Physarum* Plasmodien zeigen unter Hungerbedingungen amöboide Bewegung. Die Grundlage der Zellbewegung bildet eine ausgeprägte Cytoplasmaströmung (Wohlfarth - Bottermann, 1979), die durch oszillierende Kontraktion von Mikrofibrillen verursacht wird (Ishigami et al., 1981). Der kontraktile Apparat besteht aus Aktomyosinfilamenten (Hatano et al., 1980), die die Zelle in Form eines geordneten Netzwerkes durchziehen (Naib - Majani et al., 1982).

Viele Organismen, wie z.B. *Drosophila* und *Dictyostelium* (Tobin et al., 1980, Mc Keown et al., 1978) besitzen Familien von Aktinenen, die für Varianten des Proteins kodieren. Die Expression individueller Gene zeigt Entwicklungs- und Gewebespezifität wie durch Charakterisierung distinkter Proteinvarianten und mRNA Spezies gezeigt werden konnte (Fyrberg et al., 1983; Tsang et al., 1982). Auch *Physarum* besitzt, wie die meisten Eukaryonten, mehrere Aktingene. Untersuchungen zur Genorganisation führten zur Identifizierung von vier nicht gekoppelten Loci, von denen drei mit hoher Wahrscheinlichkeit einzelne Genkopien, der vierte dagegen möglicherweise einen Gencluster enthält (Schedl & Dove, 1982).

[The page contains extremely faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the document.]

2.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation von Aktin und Tubulin während der Sporulation von *Physarum* zu untersuchen. Zunächst sollte die Identität eines regulierten 42kD Proteins mit Aktin gezeigt werden. Im weiteren war die zeitliche Korrelation zwischen Proteinsynthese und mRNA Konzentration für Aktin und Tubulin zu analysieren. Hierfür sollten die Methoden der radioaktiven Proteinmarkierung, der zellfreien Translation und der Northern - blot Hybridisierung verwendet werden.

Für weitergehende Aussagen zur Regulation der mRNA Synthese waren Transkriptionsanalysen dieser Gene in isolierten Kernen vorgesehen. Als Vorarbeit hierzu war die Etablierung eines nuklearen Transkriptionssystems zum Studium der Transkription Polymerase 2 - abhängiger Gene erforderlich. Mit Hilfe dieses Systems sollten dann sowohl Gesamtaktivitäten als auch die spezifische Transkription der Aktin - und Tubulingene bestimmt werden.

Eine weitergehende Analyse der Genexpression setzt die Klonierung der genomischen Sequenzen voraus. Hierfür sollte eine Genbank in dem Vektor EMBL 4 angelegt und daraus genomische Tubulinsequenzen isoliert werden. Ziel der Arbeiten war es, tubulin-spezifische DNA - Fragmente in den rekombinanten Phagen zu identifizieren, isolieren und in einen geeigneten Vektor zu subclonieren.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg, BRD
Agar	Difco, Detroit, Mich., USA
Agarose	Seakem, Marine Colloids Div. FMC Corp., Rockland, ME., USA
Ampholine	LKB, Bromma, Schweden
Antifoam A	Sigma, München, BRD
Bacto- Tryptone	Difco, Detroit, Mich., USA
Bentonit	Sigma, München, BRD
DNAse 1- Sepharose	Geschenk von Dr.H.Maruta
Ficoll 400	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Gel-Fix Polyesterfolien	Serva, Heidelberg, BRD
Guanidiniumrhodanit	Fluka, Neu-Ulm, BRD
Hefeextrakt	Difco, Detroit, Mich., USA
Heringssperma DNA	Serva, Heidelberg, BRD
Hexylenglycol	Fluka, Neu-Ulm, BRD
low yelling temperature Agarose	Sigma, München, BRD
Milchfilter Hacorapid	Dr.Degen & Knuth, Düren, BRD
N,N-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg, BRD
Orange G	Sigma, München, BRD
Percoll	Pharmacia, Uppsala, Schweden
poly-U Sepharose 4B	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Polyethylenglycol 6000	Serva, Heidelberg, BRD
Radiochemikalien	Amersham-Buchler, Braunschweig: New England Nuclear, Dreieich, BRD

Reticulocytenlysat	New England Nuclear, Dreieich, BRD
Ribonukleaseinhibitor	BRL, Neu-Isenburg, BRD
Rinderserumalbumin	Sigma, München, BRD
Rotiszint 22	Zinsser, Karlsruhe, BRD
Sufynol	Serva, Heidelberg, BRD
Xylencyanblau	Sigma, München, BRD

Alle weiteren Chemikalien wurden im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von den Firmen Merck, Sigma und Serva bezogen.

3.1.2 Enzyme

E.coli DNA Ligase	Biolabs, Beverley, MA, USA
E.coli DNA Polymerase I (für nick translation)	Boehringer Mannheim, BRD
Proteinase K	Boehringer Mannheim, BRD
Reverse Transkriptase	Anglian Lab., London, UK
RNAse H	BRL, Neu-Isenburg, BRD
Restriktionsenzyme	Boehringer Mannheim, BRD
T4 DNA Ligase	BRL, Neu-Isenburg, BRD
T4 RNA Ligase	BRL, Neu-Isenburg, BRD

3.1.3 Sonstige Materialien

Cellulose-Acetat CA-250/0	Schleicher und Schüll, Dassel, BRD
DE 81 Papier	Schleicher und Schüll, Dassel, BRD
3 MM Chromatographiepapier	Whatman, England
Nitrozellulose, 0,45 um Porengröße	Schleicher und Schüll, Dassel, BRD
Röntgenfilm X-ray 90	Linhardt, München, BRD

3.1.4 Organismen

Physarum polycephalum CL: haploider Stamm (Cook & Dee, 1975)

E.coli Stämme:

Q 358, Q359: Wirtsstämme für EMBL 4 (Karn et al. 1980)

Y 1088: Wirtsstamm für λ gt 11 (Young & Davis. 1983a)

BNN 97: BNN 93 (λ gt 11) (Young & Davis. 1983b)

3.1.5 Verwendete Plasmide

pYAct I: enthält das Hefeaktingen (Ng & Abelson. 1980)

pDR 88F: enthält das Aktingen 88F von *Drosophila* (Sanchez et al. 1983). Verwendet wurde ein daraus isoliertes Kpn I / Bgl II - Fragment mit 760 bp.

pT₂: enthält eine cDNA der β -Tubulin mRNA aus Hühnerhirn (Valenzuela et al., 1981). Verwendet wurde ein daraus isoliertes Bgl II / Stu I - Fragment mit 900 bp.

pPc α -125: enthält eine cDNA Sequenz der *Physarum* α -Tubulin mRNA (Schedl & Dove, 1984). Verwendet wurde ein daraus isoliertes Bgl II / Sac I - Fragment mit 800 bp.

pPHR 11: enthält den Transkriptionsorigin der *Physarum* rDNA

pPHR 102: enthält ein 5kb rDNA - Fragment mit Sequenzen der 19S, 26S und 5.8S rRNA (Ferris & Vogt, 1982)

3.2 Kulturbedingungen

3.2.1 Medien für *Physarum* (Daniel & Baldwin, 1964)

Wachstumsmedium

Bacto-tryptone	10 g
Hefeextrakt	1,5g
Glucose	10 g
Salzlösung	120ml

pH 4,6 (mit KOH). H₂O ad 1000ml.

Salzlösung

Citronensäurex1H ₂ O	16,85g
FeCl ₂ x4H ₂ O	0,25g
MgSO ₄ x7H ₂ O	2,5 g

$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,35g
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,14g

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	2.5 g
--	-------

(getrennt gelöst und als letztes zugegeben). ad 500ml.

Sporulationsmedium (SPM):
wie Salzlösung, nur pH 4.6.

3.2.2 Medien für E.coli

LB-Medium

10g Bacto-tryptone

10g NaCl

5g Hefeextrakt

ad 1000ml

NZY-Medium

5g NaCl

2g $\text{MgCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$

10g Casamino-säuren

5g Hefeextrakt

ad 1000ml

Zur Herstellung von Agarplatten wurden die Medien mit 1,1% Bacto-Agar versetzt.

NZY-Top Agar: NZY-Medium mit 0,4% Bacto-Agar und 0,75% low-yelling agarose.

3.2.3 Züchtung von Plasmodien

Mikroplasmodien von *Physarum polycephalum* wurden in Schüttelkultur auf Wachstumsmedium gezüchtet (Daniel & Baldwin, 1964).

Zur Züchtung von Makroplasmodien wurden die Mikroplasmodien abzentrifugiert, einmal mit SPM gewaschen und in einem

Volumen SPM resuspendiert. Je 1ml dieser Suspension wurde in Petrischalen auf ein Filterpapier (Schleicher & Schüll. Nr.595) aufgetropft, das mit einem zweiten (Nr.2319/8) unterlegt war. Nach Zugabe von 4ml Wachstumsmedium wurden die Plasmodien bei 22°C inkubiert, bis sie einen Durchmesser von 8cm erreicht hatten. Nach Transfer in eine neue Petrischale wurden sie für weitere 4 Tage mit SPM inkubiert. Die Induktion der Sporulation erfolgte durch zweistündige Belichtung mit weißem Neonlicht (Osram L40W/25-1.2W/m²).

3.3 In vivo Markierung und Extraktion von Plasmodienproteinen

Für in vivo Markierungsexperimente wurden Plasmodien auf kleinen Filtern (3cm Durchmesser) gezüchtet. Diese wurden auf 0.5ml SPM welches 50-100 uCi L-³⁵S-Methionin enthielt, transferiert. Nach Ende der Markierung wurden die Filter kurz in eiskaltem Wasser gewaschen und die Plasmodien in 50mM Tris-HCl pH 7,2 abgekratzt.

Zur Extraktion der Proteine wurde die Lösung mit 0,1Vol. 6M HClO₄ versetzt und 30 min bei 0°C gehalten. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, zweimal mit 0.06M HClO₄ und einmal mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in Elektrofokussierungs- bzw SDS- Probenpuffer aufgenommen. Zur Bestimmung der in Protein eingebauten Radioaktivität wurden Aliquots der Proben mit 25% TCA, 1mg/ml Methionin gefällt (10 min, 0°C) und durch GF/C Filter filtriert. Nach ausgiebigem Waschen mit kalter 5% TCA wurde die filtergebundene Radioaktivität mittels Flüssigszintillationszählung bestimmt.

3.4 Affinitätschromatographie an DNase 1 - Sepharose (Zechel, 1980).

Puffer G:

10 mM Tris- HCl pH 7.5

0.2 mM CaCl_2

0.2 mM ATP

1 mM DTT

0,02 % NaN_3

Plasmodien wurden in 10 Vol. G (+10% Formamid) suspendiert, in einem Potter - Homogenisator aufgeschlossen und 1h bei 4°C, 100000g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine DNase1-Sepharosesäule (5mg/ml Protein, 1ml) aufgetragen. Die Säule wurde mit 2 Vol. G (+10% Formamid), 2 Vol. G (+10% Formamid+0,2M NH_4Cl) und 2 Vol. G (+10% Formamid) gespült, gebundenes Material wurde anschließend mit G (+40% Formamid) eluiert.

Radioaktiv markierte Zellextrakte wurden vor der Chromatographie mit entsprechenden Mengen unmarkierten Trägerextraktes versetzt.

3.5 RNA Isolierungen

3.5.1 Guanidiniumrhodanid-Extraktion (Chirgwin et al, 1979; Werenskiold, 1982)

Puffer A

50,0 g Guanidinium-SCN

0,5 g Na-Lauroylsarkosinat

2,5 ml 1M Trinatrium-Citrat pH 7

0,7 ml -Mercaptoethanol

0,3 ml Antifoam A

Puffer B

71.6 g Guanidinium-HCl

2.5 ml 1M Trinatrium-Citrat pH 7

5 mM DTT

beide Puffer wurden filtriert, mit NaOH auf pH 7 eingestellt und mit H_2O auf 100ml aufgefüllt.

Makroplasmoidien wurden in Anwesenheit von A (2ml pro Plasmodium) von den Filtern gekratzt und durch Schütteln lysiert. Unlösliches Material wurde abzentrifugiert (10min, 10000g), der Überstand mit 0,1 Vol. 10M LiCl und 0,75 Vol. Ethanol versetzt und über Nacht bei $-20^{\circ}C$ belassen. Das präzipitierte Material wurde abzentrifugiert (5min, $-10^{\circ}C$, 10000g), in B gelöst (1ml pro Plasmodium) und durch Zugabe von 0,1 Vol. 10M LiCl und 0,5 Vol. Ethanol erneut gefällt (3h, $-20^{\circ}C$). Dieser Fällungsschritt wurde mit halbierten Volumina wiederholt. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden schließlich abzentrifugiert, mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in sterilem H_2O gelöst.

3.5.2 Phenolextraktion (Melera et al, 1978)

Puffer A:

0.1 M Na-Acetat

1 mM EDTA

2 % SDS

1 % Bentonit, pH 6,0

Puffer B:

0,1 M Tris- Succinat, pH 8,5

0,1 M NaCl

1 mM EDTA

2 % SDS

1 % Bentonit

Puffer C:

0,1 M Tris-Succinat pH 8.5

0,7 M NaCl

1 mM EDTA

2 % SDS

1 % Bentonit

Phenolreagens Phenol. gesättigt mit Puffer A, 10% m-Kresol, 0.1% 8-Hydroxychinolin

Bentonitsuspension (Fraenkel-Conrat & Singer, 1961):

2g Bentonit wurden in 40ml H₂O suspendiert, abzentrifugiert (15min, 2000g) und der Überstand rezentrifugiert (20min, 7000g). Das Sediment wurde in 20ml 0,1M EDTA pH 7 resuspendiert und 48h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde erneut zentrifugiert wie oben angegeben, das Sediment der Rezentrifugation in 10mM Essigsäure pH 6 resuspendiert und abermals zentrifugiert (20min, 7000g). Aus dem Niederschlag wurde eine 4% Bentonitlösung (bezogen auf das Naßgewicht) in 10mM Essigsäure hergestellt.

Eine Mischung aus A und Phenolreagens (1:1, 4ml pro Plasmodium) wurde auf 60°C erwärmt, die Plasmodien wurden samt Filter in diese Lösung getaucht, durch Schütteln vom Filter gelöst und lysiert. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation (5min, Raumtemperatur, 5000g) wurde die phenolische Phase noch je einmal mit 0.5 Vol B 20 min bei Raumtemperatur und mit 0.5 Vol. C 15 min bei 45°C reextrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden einmal mit Phenolreagens, einmal mit Phenol:Chloroform 1:1 und einmal mit Chloroform reextrahiert. Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 0,1 Vol. 10M LiCl und 2,5 Vol. Ethanol aus der Lösung ausgefällt (über Nacht, -20°C).

3.5.3 Anreicherung von PolyA-RNA durch Affinitätschromatographie (Palatnik, 1981)

CSB-Puffer

25 % Formamid

0.7 M NaCl

10 mM EDTA

50 mM Tris-HCl pH 7,5.

LS-Puffer

25 % Formamid
 0.1 M NaCl
 10 mM EDTA
 50 mM Tris- HCl pH 7.5

EB-Puffer

90 % Formamid
 10 mM EDTA
 0.2 % SDS
 50 mM HEPES pH 7

3-5mg Gesamt-RNA wurden in 4ml Probenpuffer (1% SDS, 30mM EDTA pH 8) gelöst, 3min auf 60°C erwärmt und in einem Trockeneis/Ethanolbad abgekühlt. Nach Erwärmen auf 25°C wurde mit 4 Vol. CSB verdünnt und auf eine thermostatisierte PolyU-Sepharosesäule (1g, equilibriert mit CSB, 25°C) zweimal hintereinander aufgetragen (1ml/min). Die Säule wurde mit CSB-Puffer gewaschen, bis nichtgebundenes Material vollständig entfernt war (Extinktionsmessung bei 254 nm). Die gebundene RNA-Fraktion wurde anschließend bei 55°C mit LS-Puffer eluiert und durch Zugabe von 0,1 Vol. 10M LiCl und 3 Vol. Ethanol ausgefällt (-70°C über Nacht). Zur Regenerierung der Säule wurde diese mit EB-Puffer bei 55°C gewaschen und erneut in CSB equilibriert.

3.5.4 Zellfreie Translation von RNA in Reticulocytenlysat

Für zellfreie Translation wurde Gesamt-RNA verwendet, die nach der Guanidiniumrhodanidmethode isoliert worden war. Es wurde ein käufliches Translationssystem (NEN) entsprechend den Protokollen des Herstellers verwendet. Nach Ende der Inkubation wurden Translationsansätze durch Zugabe von 10 Vol. 80% Aceton gefällt (10 min, 0°C) und zur gelelektrophoretischen Analyse im entsprechenden Probenpuffer gelöst. Die in Protein eingebaute Radioaktivität wurde wie in 3.3 ermittelt.

3.6 Proteintrennungsmethoden

3.6.1 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Es wurden Plattengele (12x12x0,15 cm) mit einem linearen Acrylamidgradienten verwendet.

Lösungen	Volumen (ml)		
	Trenngel	Obergel	
	5%	20%	3%
1M Tris-HCl pH 8,8	5,2	5,2	--
1M Tris-HCl pH 6,8	--	--	1,36
H ₂ O	7,3	3,8	8,8
60% Acrylamid-			
1,6% Bisacrylamid	1,1	4,65	0,6
10% SDS	0,14	0,14	0,12
5% TEMED	0,20	0,10	0,12
1,5% Ammoniumperoxo-			
disulfat	0,10	0,10	0,40

	14ml	14ml	11,4ml

Alle Lösungen außer dem Ammoniumperoxodisulfat wurden zusammenpipettiert und entgast, anschließend das Peroxodisulfat zugegeben.

SDS-Extraktionspuffer: 0,2 M Tris-HCL pH 7,8

1 % SDS

1 % β -Mercaptoethanol

40 mM DTT

SDS-Probenpuffer: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8

5 % β -Mercaptoethanol

2 % SDS

0,005% Bromphenolblau

60 % Glycerin

Proteine wurden in Extraktionspuffer isoliert und zur Elektrophorese mit 0,1Vol. Probenpuffer versetzt.

10x Elektrodenpuffer: 0,25 M Tris

1.92 M Glycin

0.1 % SDS

pH 8.2

Elektrophoresen wurden für 15h bei 70V durchgeführt.

Coomassie-Färbung

Färbelösung: 2.2 g Coomassie-Blue G-250

80 ml Eisessig

500ml Methanol

H₂O ad 1l

Entfärbelösung: 7% Eisessig

10% Methanol

Gele wurden unter Schütteln 30min gefärbt und über Nacht entfärbt.

3.6.2 Zweidimensionale Elektrophorese in ultradünnen Gelen

Die Elektrophorese wurde entsprechend den Angaben des Herstellers der Apparatur (LKB) durchgeführt. Die verwendeten horizontalen Gele (12x25 cm) hatten eine Dicke von 240 µm (1. Dimension) bzw 360 µm (2. Dimension). Zur Erhöhung der Stabilität wurden die Gele auf Polyesterfolien (Gel-Fix) aufpolymerisiert.

Isoelektrische Fokussierung

Gellösung: 5,5 g Harnstoff

1,8ml 22,2% Acrylamid, 1,4% Bisacrylamid

4,8ml H_2O

0,5ml Ampholine pH 3,5-10

0,5ml 1.5% Ammoniumpersulfat

10 ml

Elektrodenpuffer: Anode 1.5M H_3PO_4

Kathode 2% Ethylendiamin

Probenpuffer: 9M Harnstoff

5% β -Mercaptoethanol

2% NP-40

Spannungsbegrenzung: 30 min 400V

30 min 1000V

30 min 1500V

SDS-Gradientengelelektrophorese (5-20%)

Gellösungen und Elektrodenpuffer wie unter 3.6.1

Die Gele enthielten eine Vertiefung (0,5x10x0,24 cm) in die die Elektrofokussierungstreifen eingelegt werden konnten.

Spannungsbegrenzung: 50mA,max.600V, Laufdauer 1,5h.

3.7 Fluorographie

Acrylamidgele wurden zur Fixierung des Proteins 30 min in 10% TCA, 10% Eisessig, 30% Methanol geschüttelt, zweimal je 15 min in DMSO entwässert, 1h in 20% PPO in DMSO geschüttelt und nach ausgiebigem Wässern auf 3MM Papier getrocknet. Getrocknete Gele wurden auf blitzlichtaktiviertem Röntgenfilm (Laskey & Mills, 1975) bei $-70^{\circ}C$ exponiert.

3.8 Isolierung von Zellkernen

Kernmedium (KM): 2 mM PIPES pH 7,5
 15 mM MgCl_2
 5 mM EGTA
 0,5 M Hexylenglycol
 1.1 % Surfynol

Gradientenlösung: 90 ml Percoll
 10 ml 10xKM
 156 ml 1xKM

Alle Schritte der Isolierung wurden bei 4°C durchgeführt

Die Plasmodien wurden kurz in eiskaltem Wasser geschwenkt, vom Filter gekratzt, in KM (10-15ml pro Plasmodium) suspendiert und in einem Braun Mixer aufgeschlossen: 20 sec Stufe 1, 40 sec (Wachstumsplasmodien) bzw 60 sec (Hungerplasmodien) Stufe 3. Das Homogenat wurde durch 2 Lagen Milchfilter filtriert und abzentrifugiert (5min, 5000g). Der Niederschlag wurde in wenig KM resuspendiert, je 0,5ml der Suspension wurden mit 9,5ml der Gradientenlösung gemischt und zentrifugiert (15min, 23000g). Die Kernbande wurde isoliert, mit 10 Vol. KM versetzt und die Kerne pelletiert. Die isolierten Kerne wurden in KM in einer Konzentration von etwa $10^8/\text{ml}$ aufgenommen und direkt für Transkriptionsversuche eingesetzt oder zur Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Bestimmung der Konzentration wurden Aliquots der Präparate in 2M KCl, 5M Harnstoff lysiert (1-2h bei Raumtemperatur), anschließend wurde die Extinktion bei 260nm gemessen ($E_{260}=1$ entspricht 10^7 Kernen/ml).

3.8.1 In vitro Transkription in isolierten Kernen

Transkriptionsmedium:

0.5	M	Hexylenglycol
5	mM	MgCl ₂
2	mM	PIPES pH 7.5
1	mM	MnCl ₂
0.5	mM	DTT
250	mM	KCl
75	uM	ATP, GTP, CTP

Zur Bestimmung der Gesamtaktivität wurden 100 μ l Ansätze (10^6 Kerne), 0,8 uCi ^3H -UTP (46Ci/mMol) verwendet. Nach Ende der Inkubation wurden die Ansätze mit 1ml 10% TCA, 1% Na-Pyrophosphat versetzt, 10min bei 0°C belassen und durch GF/C Filter filtriert. Nach Waschen der Filter wurde die gebundene Radioaktivität mittels Flüssigszintillationszählung bestimmt.

Für Versuche zur spezifischen Transkription wurden 200 μ l assays (2 - 6×10^6 Kerne) und 20-100 uCi $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP (400 Ci/mMol) verwendet.

3.8.2 Isolierung markierter Kern-RNA

Transkriptionsansätze wurden nach Ende der Inkubation mit SDS (ad 1%) und 1 Vol. Phenol versetzt und 10min bei Raumtemperatur extrahiert. Die organische Phase wurde einmal mit 0,5 Vol. 0,1 M Tris-succinat pH 8,5, 0,1M NaCl, 1 mM EDTA, 2% SDS reextrahiert, die vereinigten wässrigen Phasen anschließend noch einmal mit Ether extrahiert. Die RNA wurde durch Zugabe von 0,1 Vol. 10M LiCl und 3 Vol. Ethanol ausgefällt (-70°C, über Nacht) und zur Abtrennung der Nukleotide in 100 μ l sterilem H₂O gelöst und durch eine Sephadex G-50 Säule (1ml) zentrifugiert.

3.9 Isolierung chromosomaler DNA aus Physarum

10^8 - 10^9 Zellkerne wurden in 5 ml 50 mM Tris-HCl pH 8, 50mM EDTA, 0.5% Na- Lauroylsarkosinat mit 0.5 mg/ml Pronase 2h bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 12000g) wurde der Überstand dreimal mit Phenol und einmal mit CHCl_3 vorsichtig extrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 0.1 Vol. 10M LiCl und 2.5 Vol. Ethanol gefällt (30 min -70°C). Nach vorsichtigem Lösen der DNA in 5ml TE-Puffer wurde mit 0.1 mg/ml RNase A (10 min bei 80°C vorinkubiert) für 30 min bei 56°C inkubiert, je einmal mit Phenol und CHCl_3 extrahiert und repräzipitiert.

3.10 Isolierung von Plasmiden (Birnboim & Doly, 1979)

Puffer A: 50 mM Glucose

25 mM Tris-HCl pH 8

10 mM EDTA

Puffer B: 0.2 N NaOH

1 % SDS

Puffer C: 60 ml 5M K- Acetat

11.5 ml Eisessig

+ H_2O ad 100 ml

3.10.1 Minipräparation

1,5 ml einer E.coli Übernachtskultur wurden abzentrifugiert. der Zellschlag in 100 μl Puffer A suspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 150 μl Puffer B und 5 min Inkubation im Eisbad wurden 120 μl eiskalter Puffer C zugesetzt. durch Stürzen gemixt und 2min abzentrifugiert. Der Überstand wurde je einmal mit 1 Vol. Phenol und 1 Vol. CHCl_3 extrahiert und nach Zugabe von 2

Vol. Ethanol 2 min bei Raumtemperatur belassen. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden abzentrifugiert, mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 2,5 µg RNase A wurde 10 min bei 56°C inkubiert, die DNA anschließend erneut präzipitiert.

3.10.2 Plasmidisolierung in großem Maßstab

In 2l Kulturen wurden Plasmide bei einer OD_{600} von 0,6 durch Zugabe von 150 µg/ml Chloramphenicol über Nacht amplifiziert, die Zellen abzentrifugiert (10 min, 4000 g, 4°C) und in 40 ml Puffer A resuspendiert (5 min bei Raumtemperatur). Nach Überführen der Suspension in TFA-20 Zentrifugenbecher wurden 80 ml Puffer B zugesetzt, vorsichtig gemischt, 10 min im Eisbad inkubiert, 60 ml kalter Puffer C zugegeben und für weitere 10 min im Eis belassen. Die ausgefällte chromosomale DNA wurde abzentrifugiert (30 min, 18000 rpm, 4°C, TFA-Rotor), der Überstand isoliert und nach Zugabe von 0,6 Vol. Isopropanol 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Die gefällten Nukleinsäuren wurden pelletiert (30 min, 12000 g), in 30 ml TE-Puffer gelöst und über zwei CsCl-Gradienten gereinigt. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit 1g/g CsCl und 0,5mg/g Ethidiumbromid versetzt und 40h, 40000 rpm, 20°C (Ti 60 Rotor, Beckman) zentrifugiert. Die Plasmidbande wurde aus dem Gradienten isoliert und unter gleichen Bedingungen in einem Ti 50 Rotor (Beckman) rezentrifugiert. Die isolierte Plasmidfraktion wurde zur Entfernung des Ethidiumbromids mehrfach mit TE-gesättigtem Isobutanol extrahiert und nach Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol über Nacht bei 0°C gefällt.

3.11 Isolierung von Plasmidinserts

3.11.1 Elution aus Agarosegelen

(1.) Elution in einen Dialyseschlauch

Geschnittenes Plasmid (20-50 ug) wurde in 1% Agarosegelen fraktioniert, gefärbt und die Insertbande aus dem Gel ausgeschnitten. Die Agarosestücke wurden in einen Dialyseschlauch überführt und die DNA daraus mittels Elektroelution isoliert. Hierzu wurde der Dialyseschlauch in 40 mM Tris-Acetat pH 7,8, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA in einer Gelelektrophoresekammer für 20 min bis 2h bei 300 V belassen. Die Elution wurde beendet, sobald die Ethidiumbromidfärbung quantitativ aus dem Agarosestück entfernt war. Vor Isolierung der DNA aus dem Dialyseschlauch wurde für 30 sec umgepolt, um die DNA von der Membran zu lösen. Die DNA-Lösung wurde über Milliporefilter (Porengröße 0,45 um) sterilfiltriert, einmal mit Phenol extrahiert und das gereinigte Insert ausgefällt. (2.) Elution auf DE 81 Papier

Waschpuffer

10 mM Tris-HCl pH 7,5

1 mM EDTA

0.1 M LiCl

Elutionspuffer

20 % Ethanol

1 M LiCl

10 mM Tris-HCl pH 7,5

1 mM EDTA

Geschnittene Plasmid - DNA wurde in Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Jeweils knapp ober - und unterhalb des gewünschten DNA - Fragmentes wurden Stücke von DE 81 Papier in das Gel eingelegt. anschließend wurde die Elektrophorese fortgeführt, bis die gefärbte Gelbande vollständig an das Papier adsorbiert worden war (etwa 1h bei 100 V). Der isolierte Papierstreifen wurde in ein Eppendorf - Gefäß überführt, das unten mit silikonisierter Glaswolle gefüllt und angestochen worden war. Es wurde mehrfach mittels Zentrifugation mit Waschpuffer gewaschen und anschließend viermal mit je 100ul Elutionspuffer eluiert. Die isolierte DNA wurde durch Zugabe von 1ml Ethanol ausgefällt (über Nacht bei -20°C), in 500ul TE - Puffer aufgenommen, sterilfiltriert und noch einmal umgefällt.

3.11.2 Zentrifugation im neutralen Sucrosegradienten

Gradientenlösungen: 5%, 20% und 75% Sucrose in 1 M NaCl, 4 µg/ml Ethidiumbromid.

Pro Zentrifugenröhrchen wurde 1 ml 75% Sucroselösung vorgelegt und mit einem linearen Sucrosegradienten (10 ml. 5 - 20%) überschichtet. Pro Röhrchen wurden 100-200 µg geschnittenen Plasmids aufgetragen. Nach der Zentrifugation (4,5h, 20°C, 40000rpm, TST 41 Rotor, Beckman) wurde die Bande aus dem Gradienten isoliert und das Ethidiumbromid mit Isobutanol extrahiert. Die Plasmid DNA wurde aus der wässrigen Phase nach Verdünnung mit TE-Puffer (1:1) ausgefällt.

3.12 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Es wurden Flachgele von 20x20x0,3 cm verwendet.

3.12.1 Denaturierendes Formaldehyd- Agarosegel (Lehrach et al, 1977)

10x Gelpuffer: 0.2 M MOPS, pH 8

50 mM Na-Acetat

5 mM EDTA

Laufpuffer: wie Gelpuffer, nur pH 7

Die Agarose (1,5 bzw 2%) wurde in H₂O aufgeköcht, auf 60°C abgekühlt und mit 10x Gelpuffer und Formaldehyd ad 2,2 M versetzt.

Probenpuffer: 1x Gelpuffer

2.2 M Formaldehyd

50 % Formamid

0,4 % Bromphenolblau

0,4 % Xylencyanblau

0,4 % Orange G

RNA wurde mit 4 Vol. Probenpuffer versetzt. 10 min auf 65°C erhitzt und nach dem Abkühlen aufgetragen.
 Laufbedingungen: 1,5% : 600 Vh, 2% : 900 Vh.

Färbung der Gele: nach der Elektrophorese wurden die Gele 1h in H₂O bzw. 50 mM Tris- HCl pH 7 geschüttelt. anschließend 1-5h mit Ethidumbromid (1 ug/ml in H₂O) angefärbt.

3.12.2 Nicht-denaturierende Agarosegele

Für die Trennung von DNA wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0.3 und 1.5% verwendet.

Loening-Puffer: 0.36 M Tris- acetat pH 7.8

0.3 M NaH₂PO₄
 10 mM EDTA

Ethidiumbromidfärbung: Gele wurden 15 min in 1 ug/ml Ethidiumbromid in Laufpuffer angefärbt.

3.13 Hybridisierung filtergebundener Nukleinsäuren

3.13.1 Transfer von RNA auf Nitrozellulose (Thomas, 1983)

RNA wurde in denaturierenden Agarosegelen getrennt (Lehrach et al., 1977). Die Gele wurden 5 min gewässert, 5 min in 10xSSC inkubiert und in 10xSSC über Nacht auf Nitrozellulose übertragen. Der Nitrozellulosefilter wurde anschließend 2h bei 80°C in einem Vakuumofen gebacken.

3.13.2 Transfer von DNA auf Nitrozellulose (Southern, 1975)

DNA Gele wurden vor dem Transfer in folgenden Lösungen inkubiert:

2 x 7 min 0.25 M HCl

2 x 15 min 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl

2 x 15 min 0.5 M Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl

anschließend wurde die DNA in 20xSSC über Nacht an Nitrozellulosefilter gebunden. Nach dem Transfer wurden die Filter 2h bei 80°C im Vakuumofen gebacken.

3.13.3 Bindung von Plasmid-DNA an Nitrozellulose (dot-blot)

Plasmide wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert und in wenig sterilem H₂O aufgenommen. Die Lösungen wurden zum Denaturieren der DNA 10 min auf 100°C erhitzt, schnell auf 0°C abgekühlt, mit 1 Vol. 20x SSC versetzt und auf Nitrozellulosestreifen aufgetropft. Diese wurden anschließend 2h bei 80°C im Vakuumofen gebacken.

3.13.4 Hybridisierung und Waschen der Filter

Hybridisierungspuffer: 5x SSC

1x PB (120mM Na-Phosphat pH 7,2)

1% Na- Lauroylsarcosinat

0.1% SDS

5x Denhards

50% Formamid

5mM EDTA

Nach dem Backen wurden die Nitrozellulosefilter kurz in 2x SSC, 1% SDS gewaschen und 5-20h in Hybridisierungspuffer mit 0.1 mg/ml Heringssperma-bzw Halobakterien DNA bei 42°C vorhybridisiert. Anschließend wurde im gleichen Puffer mit 5×10^5 - 5×10^6 cpm/ml der jeweiligen nick- translatierten DNA (10^7 - 10^8 cpm/ug) für 24-48h bei 42°C hybridisiert.

Die Waschbedingungen der Southern- und Northernblots wurden den unterschiedlichen Hybridisierungseigenschaften der Plasmide entsprechend variiert. Unter den angeführten Bedingungen wurde jeweils für 2h unter mehrfachem Wechsel der Waschlösung inkubiert:

pDr 88F	2xSSC	42°C
pT ₂	3xSSC	50°C

pPc α 125 1xSSC 50°C

dot blot Hybridisierungen wurden bei 42°C mit 1xSSC gewaschen.

Nach dem Waschen wurden die Filter luftgetrocknet und unter Verwendung von Verstärkerfolien (Trimax) autoradiographiert.

3.13.5 Radioaktive Markierung von DNA durch nick - Translation (Maniatis et al. 1975)

5x nt- Puffer: 0,5 M Tris-HCl pH 7,5
50 mM MgCl₂
500 uM der drei nicht radioaktiv markierten dNTPs

Reaktionsansatz: 20 ul 5x nt- Puffer
5 ul E.coli DNA-Polymerase I (25 U)
50 uCi α -³²P-dNTP
1 ug Plasmid- DNA

+ H₂O ad 100 ul

Inkubation: 3h bei 18°C

Nach Ende der Inkubation wurden freie Nukleotide aus dem Reaktionsansatz durch Zentrifugation durch eine Sephadex G-50 Säule (1 ml) abgetrennt. Die spezifische Aktivität der markierten DNA lag bei 10⁷-10⁸ cpm/ug.

3.14 EMBL 4 - Clonierung

3.14.1 Isolierung des Vektors EMBL4

Es wurde 1 ml einer Übernachtskultur der Wirtsbakterien in LB Medium (0.2% Maltose) mit 10^5 - 10^6 pfu der Phagenlösung versetzt und 15 min bei 42° C inkubiert. Anschließend wurden mit dieser Kultur 500 ml NZY Medium inokuliert und über Nacht (37°) geschüttelt.

Die lysierte Kultur wurde mit je 1mg/l DNase 1 und RNase A versetzt und 30 min bei Raumtemperatur belassen. Nach Zugabe von NaCl ad 1M wurde 1h bei 0° C belassen, Zelldebris abzentrifugiert (5 min, 4° C, 11000 g) und die Phagen aus dem Überstand durch Zugabe von PEG ad 10 % ausgefällt (1h 0°). Die Phagen wurden pelletiert (10 min 4°, 11000g), in 8 ml SM aufgenommen und mit Chloroform extrahiert.

Die isolierte wässrige Phase wurde mit 0,5 g/ml CsCl versetzt und auf einen CsCl-Stufengradienten aufgetragen.

Herstellung des CsCl-Stufengradienten:

Es wurde ein TST41 Rotor (Beckman) verwendet.

Pro Zentrifugenröhrchen wurde je 1 ml der folgenden CsCl Lösungen in SM vorgelegt:

Dichte	CsCl(g)	SM(ml)
1.45	60	85
1.5	67	82
1.7	95	75

Die Gradienten wurden für 2h bei 22000 rpm 20° C zentrifugiert.

Die Phagen bandierten an der Interphase zwischen den Stufen mit 1.45 g/ml und 1.5g/ml und wurden in CsCl-Lösung im Kühlschrank aufbewahrt.

3.14.2 Isolierung der Vektor DNA

Die Phagenlösung wurde 2 h bei Raumtemperatur gegen SM dialysiert, mit EDTA ad 20mM und Natriumlauroylsarcosinat ad 1 % versetzt und mit 0.5 mg/ml Pronase 1 h bei 37° inkubiert. Anschließend wurde die Lösung je einmal mit Phenol und Chloroform extrahiert und über Nacht bei 4° gegen TEpuffer dialysiert.

3.14.3 Präparation der Vektor-Arme

Die Vektor DNA wurde mit einem 20fachen Überschuß an Restriktionsenzym (Bam H1) vollständig geschnitten. Zur Umgehung einer Religierung der Vektorarme mit dem stuffer-Fragment wurden die 5'-Phosphatreste entfernt.

10 x Phosphatasepuffer: 0,5M Tris HCl pH 9.0

10mM MgCl₂

1mM ZnCl₂

10mM Spermidin-HCl

Reaktionsansatz: 25µl Vektor DNA in H₂O (50 µg)

3µl 10 x Puffer

2µl alkalische Phosphatase (0.8 U)

Σ = 30µl

Inkubation : 30 min. bei 37°

Nach Beendigung der Inkubation wurde einmal mit Phenol und dreimal mit Ether extrahiert, die DNA wurde durch Zugabe von 2 Vol Ethanol gefällt (-20°).

3.14.4 Herstellung von 12 - 18kb Fragmenten chromosomaler DNA

Zur Herstellung der DNA-Fragmente wurden Partialverdaus mit dem Restriktionsenzym Sau 3A durchgeführt. In einem Vorversuch wurde die Enzymkonzentration bestimmt, die unter

den gewählten Bedingungen (2 μg DNA in 100 μl : Inkubation für 60 min bei 37°) eine maximale Ausbeute an DNA-Fragmenten der Größe von 12-18 kb lieferte.

Unter den gewählten Bedingungen wurden dann je 80 μg DNA für 30, 60 und 90 min inkubiert.

Fraktionierung der DNA durch Sucrosegradientenzentrifugation: Es wurden lineare Sucrosegradienten von 10 % - 40 % Sucrose in 1M NaCl, 20mM Tris HCl pH 8.0, 5mM EDTA (38 ml pro Gradient) hergestellt. Die DNA wurde 10 min auf 65° C erhitzt, abgekühlt und auf den Gradienten aufgetragen. In einem SW27 Rotor (Beckman) wurde 14 h bei 20° C und 26000 rpm zentrifugiert.

Gradienten wurden in 0,5 ml Aliquots fraktioniert. je 20 μl der Fraktionen wurden in 0,4 % Agarosegelen analysiert.

Fraktionen mit DNA-Fragmenten zwischen 12 und 18 kb wurden über Nacht bei 4° C gegen TE-Puffer dialysiert. einmal mit Phenol und dreimal mit Ether extrahiert und durch Zugabe von 2 Vol Ethanol gefällt.

3.14.5 Ligierung und in vitro packaging

10 x Ligasepuffer: 250mM Tris-HCl pH7,4

100mM MgCl_2

100mM DTT

2mM Spermidin-HCl

Ligierungsansatz : 5 μl Vektor DNA (4,4 U)

16 μl chromosomale DNA (200 ng)

2,5 μl 10 x Ligasepuffer

1 μl Ligase (20 U)

0,5 μl H_2O

Σ = 25 μl

Inkubation : 24 h. 15° C

Die für das in vitro packaging der DNA benötigten Extrakte wurden von M. Monteiro zur Verfügung gestellt. Das

Endvolumen der Reaktionsansätze betrug 500 μ l.

3.14.6 Plattierung rekombinanter Phagen

Es wurden Kulturen der Wirtsbakterien in LB (Q358) bzw TE Medium (Q359) mit 0,2 % Maltose hergestellt.

100-200 μ l der Bakterienkultur wurden mit 5-50 μ l Phagenlösung (10^2 - 10^4 pfu) infiziert und 10 min bei 42° C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml auf 45° temperierten NZY-Topagars wurde auf NZY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37° inkubiert.

3.14.7 Identifizierung rekombinanter Clone

Übertragung von Phagen DNA auf Nitrozellulosefilter

Aliquots der in vitro packaging Ansätze (ca. 3000 Plaques pro Agarplatte) wurden auf getrockneten NZYplatten ausplattiert (siehe 6.). Nach Ende der Inkubation wurden die Platten 1 h bei 4° inkubiert. Zur Übertragung der Phagen auf Nitrozellulose wurden Filter luftblasenfrei auf den Topagar gelegt und 1 min (1. Replika) bzw. 5 min (2. Replika) dort belassen. Anschließend wurden die Nitrozellulosefilter jeweils 5 min auf 3MM Papier gelegt, welches mit folgenden Lösungen getränkt war:

1.) 0.5M NaOH

1.5M NaCl

2.) 1M Tris HCl pH7,5

3.) 0.5M Tris HCl pH7,5

1.5M NaCl

Die so behandelten Nitrozellulosefilter wurden luftgetrocknet und anschließend 2 h bei 80° in einem Vakuumofen gebacken.

Hybridisierung der Replikafilter

Die gebackenen Nitrozellulosefilter wurden kurz in 3 x SSC, 1 % SDS gewaschen und in Hybridisierungspuffer (50 % Formamid, 50mM Tris HCl pH7,5, 5 x SSC, 5 x Denhards, 1 % Natriumlauroylsarcosinat) mit $0,5-1 \times 10^5$ cpm/ml radioaktiv markierter Hybridisierungsprobe (10^7-10^8 cpm/ μ g) für 15-18 h bei 42° C inkubiert.

Die Waschbedingungen wurden für verschiedene Hybridisierungsproben variiert (siehe 9.3). Die gewaschenen Filter wurden getrocknet und für 12-48 h autoradiographiert (siehe 9.5).

Isolierung positiver Clone

Positive Plaques wurden anhand der Autoradiographie identifiziert. Mit sterilen Pipetten wurden aus dem Topagar

Stücke ausgestanzt, welche die positiven Plaques enthielten und in 500 μ l SM/10 μ l Chloroform überführt.

Minipräparation von Phagen DNA

Zur Amplifizierung positiver Clone wurden Phagen in einer Konzentration ausplattiert, welche zu confluenten Lyse des Bakterienrasens führte. Die Agarplatte wurde mit 5 ml SM überschichtet und 2 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4° C inkubiert.

Der Überstand wurde abgenommen, mit 1 μ g/ml DNase 1 und 50 μ g/ml RNase A versetzt und 30 min bei 37° inkubiert. Zellen und Agarpartikel wurden abzentrifugiert (5 min 10000 g), die Phagen wurden aus dem Überstand gefällt durch Zugabe von 1/4 Vol 30 % PEG, 2,5M NaCl (1 h, 0° C).

Die Phagen wurden pelletiert (10 min, 10000 g, 4°), in 500 μ l SM suspendiert, durch Zugabe von EDTA ad 20mM und Natriumlauroylsarcosinat ad 1 % lysiert und mit 0.5 mg/ml Pronase 1 h bei 37° inkubiert. Nach Phenol- und Chloroformextraktion wurde die DNA durch Zugabe von 2 Vol Ethanol und 1/10 Vol 10M LiCl ausgefällt (30 min, -70° C). Für Restriktionsanalysen wurde 1/2 bis 1/5 der von einer Agarplatte isolierten DNA verwendet.

3.15 Allgemein verwendete Reagenzien und Puffer

100 x Denhardslösung:	2% Ficoll Typ 400
	2% Polyvinylpyrrolidon
	2% Rinderserumalbumin
20 x SSC:	3 M NaCl
	0,3 M Na - Citrat, pH 7,2
TE - Puffer:	10 mM Tris - HCl pH 8
	1 mM EDTA
Phenol:	0.1% an 8 - Hydroxychinolin

gesättigt mit TE - Puffer

CHCl_3

24 : 1 CHCl_3 : Isoamylalkohol

4. ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung von Aktinvarianten in *Physarum* - Plasmodien

Während der Sporulation von *Physarum* - Plasmodien wird die Synthese eines prominenten 42 kD Proteins inhibiert (Putzer et al., 1984). Molgewicht und zelluläre Konzentration dieses Proteins führten zu der Annahme, daß es sich um Aktin handelte. Zu seiner Identifizierung sollte eine charakteristische Eigenschaft cytoplasmatischen Aktins, nämlich seine hochspezifische Bindung an DNase 1 (Zechel, 1980) dienen.

Aus logarithmisch wachsenden Mikroplasmodien wurden lösliche Proteine in Puffer G (10mM Tris - HCl pH 7.5, 0.2mM CaCl_2 , 0.2mM ATP, 1mM DTT, 0.02% NaN_3 , +10% Formamid) isoliert und über eine DNase 1 - Sepharosesäule chromatographiert. Die Säule wurde mit dem gleichen Puffer und mit Puffer G mit 0.2M NH_4Cl (+10% Formamid) gewaschen, gebundenes Material anschließend durch Erhöhung der Formamidkonzentration (40%) eluiert. Aliquots der Fraktionen wurden mittels Polyacrylamid - Gelelektrophorese analysiert. Wie in Abb. 1 dargestellt, konnte auf diese Weise das 42 kD Protein spezifisch aus dem Gesamtproteinextrakt abgereichert werden (Abb. 1, Spur a und b), die mit 40% Formamid eluierte Fraktion enthielt ausschließlich das 42 kD Protein (Spur c). Da die anschließenden Untersuchungen zur Regulation der Aktinsynthese eine radioaktive Markierung des Proteins erforderlich machten, wurde auch zur Proteincharakterisierung mit ^{35}S - Methionin radioaktiv markiertes Aktin eingesetzt. Das mittels Affinitätschromatographie isolierte *Physarum* Aktin wurde durch isoelektrische Fokussierung

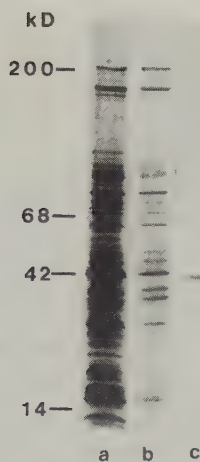


Abb.1 Isolierung von Aktin durch Chromatographie an DNase 1 - Sepharose. Mikroplasmodien wurden in Puffer G (10mM Tris - HCl pH 7,5, 0,2mM CaCl_2 , 0,2mM ATP, 1mM DTT) + 10% Formamid aufgenommen, homogenisiert und zentrifugiert (1 Stunde, 4°C , 100000g). Der Überstand (a) wurde auf eine DNase 1 - Sepharose Säule aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit Puffer G + 10% Formamid, Puffer G + 10% Formamid + 0,2M NH_4Cl und Puffer G + 10% Formamid gewaschen (b) und Aktin schließlich mit Puffer G + 40% Formamid eluiert (c). Aliquots der Fraktionen wurden in einem linearen SDS - Polyacrylamid - Gradientengel (5 - 20%) aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie - Blau angefärbt.

aufgetrennt. Hierzu wurden Plasmodien mit ^{35}S - Methionin markiert. Aktin wurde isoliert und in ultradünnen Elektrofo-kussierungsgelen aufgetrennt. Hierbei konnten drei Hauptban-den mit apparentem pI von 5.2, 5.3 und 5.6 unterschieden werden (Abb. 2A).

Analog wurde mit ^{35}S - Methionin markiertes Gesamtprotein aus sporulierenden Zellen isoliert und in ultradünnen Gelen zweidimensional aufgetrennt (isoelektrische Fokussierung / SDS - Gelelektrophorese). Die Fluorographie der Gele zeigte in der 42 kD Region ein mit isoliertem Aktin übereinstimmen-des Bandenmuster (Abb. 2B). Obwohl die Aktinsynthese in sporulierenden Plasmodien signifikant erniedrigt war, stimmte die relative Konzentration der drei Aktinvarianten in den beiden Entwicklungsstadien überein. Es lag daher die Annahme nahe, daß es sich um drei co - regulierte Proteinvarianten handelt, die möglicherweise von verschiedenen mRNA Spezies codiert werden. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden die für Aktin codierenden mRNA - Spezies durch zellfreie Translation charakterisiert. Die zellfreie Proteinsynthese an isolierter RNA sollte zeigen, ob in dem heterologen System unterschiedliche für Aktin codierende mRNA Spezies erkannt werden. Hierfür wurde aus hungernden Plasmodien Gesamt - RNA extrahiert und im Reticulocytensystem in vitro translatiert. Die in vitro synthetisierten Proteine wurden anschließend zweidimensional aufgetrennt wie oben beschrieben. Abb. 2C zeigt das Bandenmuster der 42 kD Region des Gels. Die Übereinstimmung der Proteinbanden in den Abb. 2A, B und C hinsichtlich ihrer relativen Konzentration und elektrophoretischen Mobilität deutet darauf hin, daß die drei Aktinbanden Isoformen des Proteins darstellen, die von drei distinkten mRNAs codiert und gemeinsam reguliert werden.

4.1.1 Inhibition der Aktinsynthese im Laufe der Sporulation

Zur Quantifizierung der differenzierungsabhängigen Änderung der Aktinsynthese in vivo wurden induzierte Zellen von 11h bis 17h nach Induktionsbeginn mit ^{35}S - Methionin markiert. Dieser Zeitraum umfaßt die Phase der Morphogenese, die durch eine Reduktion der Aktinsynthese charakterisiert ist (Putzer et al., 1984). Aus dem extrahierten Protein wurde Aktin mittels Chromatographie an DNAse - 1 - Sepharose isoliert und durch Elektrophorese in einem linearen SDS - Polyacrylamidgel (5 - 20%) getrennt. Wie in Abb. 3 gezeigt, war die Menge derart isolierten, radioaktiv markierten Aktins aus sporulierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich erniedrigt. Die densitometrische Auswertung der Autoradiographie ergab eine Reduktion der Aktinsynthese um 95%, bezogen auf die gesamte in Protein inkorporierte Radioaktivität. Mögliche Ursachen hierfür wären eine Inhibition der Aktinsynthese oder erhöhte Aktindegradation.

Eine Inhibition der Aktinsynthese könnte auf dem Verlust translatierbarer mRNA - Sequenzen beruhen. Deshalb wurde die Menge an translatierbarer Aktin - mRNA bestimmt. Hierzu wurde Gesamt - RNA aus hungernden und sporulierenden Plasmodien (12h nach Belichtungsbeginn) isoliert und in vitro translatiert. In vitro synthetisiertes Aktin wurde isoliert und gelelektrophoretisch getrennt wie oben beschrieben. Die densitometrische Auswertung der Autoradiographie ergab eine Reduktion des an RNA aus sporulierenden Plasmodien in vitro synthetisierten Aktins um 92% (Abb. 3).

Um den Verlust von Aktin - mRNA Sequenzen in der poly A - RNA Fraktion sporulierender Zellen direkt zu zeigen, wurden Northern - blot Hybridisierungen mit dem heterologen Plasmid pYAct 1 (Ng & Abelson, 1980) durchgeführt, welches das Hefeaktinogen enthält (siehe 4.3). Poly A - RNA wurde aus Plasmodien 15h nach Induktionsbeginn und aus Kontrollzellen isoliert, in denaturierenden Agarose - Formaldehydgelen fraktioniert, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem

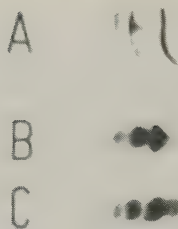


Abb.2 Trennung von drei Aktinvarianten. (A) Hungernde Plasmodien wurden in vivo mit ^{35}S - Methionin markiert. Aus dem Proteinextrakt wurde Aktin mittels Chromatographie an DNase 1 - Sepharose isoliert und durch isoelektrische Fokussierung in einem ultradünnen Gelaufgetrennt. (B) Gesamtprotein sporulierender Plasmodien wurde wie in (A) markiert und in einem ultradünnen Gel zweidimensional (isoelektrische Fokussierung / SDS - Gelelektrophorese) aufgetrennt. Der dargestellte Ausschnitt des Gels zeigt die 42kD Region. (C) Gesamt RNA aus hungernden Plasmodien wurde in Reticulocytenlysat translatiert, die Translationsprodukte gelelektrophoretisch getrennt wie in (B). Dargestellt ist der entsprechende Ausschnitt aus dem zweidimensionalen Gel. Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus den Fluorogrammen der Gele.

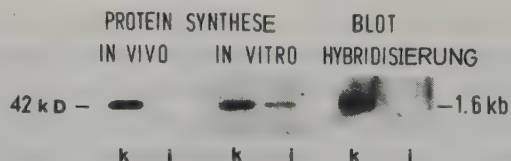


Abb.3 Inhibition der Aktinsynthese während der Sporulation. (A) Hungernde (k) und sporulierende (i) Plasmodien (12 Stunden nach Induktionsbeginn) wurden mit ^{35}S - Methionin pulsmarkiert. Aktin wurde durch Affinitätschromatographie an DNase 1 - Sepharose isoliert, in einem SDS - Polyacrylamid - Gradientengel (5 - 20%) aufgetrennt und fluorographiert. (B) Isolierte Gesamt RNA aus hungernden und sporulierenden Plasmodien (12 Stunden p.i.) wurde zellfrei translatiert, die Translationsprodukte wie in (A) analysiert. (C) je Sug polyA - RNA aus hungernden und sporulierenden Plasmodien (15 Stunden p.i.) wurde in einem denaturierenden 1.5%igen Agarose / Formaldehydgel fraktioniert, auf Nitrocellulose transferiert und gegen das radiolabelierte Aktin-

radioaktiv markierten Plasmid pYAct 1 hybridisiert. Das dargestellte Autoradiogramm (Abb.3) zeigt die spezifische Hybridisierung des Hefegens mit einer 1.6 kb RNA - Spezies in der poly A - RNA aus Kontrollzellen. In der poly A - RNA aus sporulierenden Zellen waren die entsprechenden Sequenzen nicht nachweisbar. Diese Daten belegen, daß die Inhibition der Aktinsynthese auf dem Verlust der codierenden mRNA beruht. Für weitergehende Analysen zur Regulation der mRNA - Synthese war die Etablierung eines nukleären Transkriptionssystems notwendig.

4.2 Transkription in isolierten Zellkernen

4.2.1 Isolierung von Zellkernen

Die Kernisolierung wurde nach einem Protokoll von D. Nothacker und A.Hildebrandt durchgeführt. Charakteristika dieser Methode sind die Benutzung des Detergens Surfyndol und die osmotische Stabilisierung der Kerne in isotonischem Hexylenglycol (0,5 M). Die Reinigung der Kerne erfolgte mittels Zentrifugation durch einen Percollgradienten. Derart erhaltene Präparationen enthielten keine lichtmikroskopisch sichtbaren Verunreinigungen.

Zur Isolierung von Kernen aus Plasmodien verschiedener Entwicklungsstadien waren Variationen in den Aufschlußbedingungen nötig. Während der Aufschluß wachsender Zellen unter schonenden Bedingungen möglich war, mußten diese zur Homogenisierung hungernder bzw sporulierender Plasmodien drastisch verschärft werden (Verlängerung der Homogenisierungsdauer in einem Braun-Mixer von 40 sec auf 5 min). Aus sporulierenden Plasmodien war die Isolierung von Kernen bis zu einem Zeitpunkt etwa 15h nach Induktionsbeginn möglich, bei späteren Differenzierungsstadien waren Aufschlußbedingungen erforderlich, die zu einer Schädigung der Zellkerne führten.

Da für in vitro Transkriptionsversuche die Intaktheit der

präparierten Kerne von großer Bedeutung war, wurde im weiteren zugunsten schonender Homogenisierungsbedingungen (1 min) auf hohe Ausbeuten verzichtet. Unter den gewählten Bedingungen lagen die Ausbeuten typischerweise bei $0.5 - 1 \times 10^7$ Kernen pro Plasmodium für wachsende Zellen und $0.2 - 5 \times 10^6$ Kernen pro Plasmodium für hungernde Zellen.

Die Intaktheit und Homogenität der isolierten Kerne wurde durch Analyse der Präparate im Durchflußcytofluorimeter belegt (siehe Anhang).

4.2.2 Standardisierung der in vitro Transkriptionsbedingungen

Für Standardisierungsexperimente wurden Kerne aus wachsenden Plasmodien verwendet, da diese die höchste Transkriptionsaktivität aufwiesen. Bestimmt wurde der Einbau von ^3H -UTP in säurefällbares, alkalilabiles Material. Die Gültigkeit der Ergebnisse für Zellkerne anderer Entwicklungsstadien wurde in Stichproben überprüft.

Für Standardisierungsexperimente wurden ausschließlich Reaktionsansätze mit 10^6 Kernen und $0,8 \text{ uCi } ^3\text{H-UTP}$ in 100 ul verwendet.

Zeitabhängigkeit

Die RNA - Syntheseaktivität wurde über einen Zeitraum von 90min gemessen. Wie in Abb 2A dargestellt, wurde über einen Zeitraum von 60 min ein hoher Einbau an $^3\text{H-UTP}$ erhalten, eine weitere Verlängerung der Inkubationsdauer und Zugabe von ^3H -UTP resultierte in keiner weiteren signifikanten Steigerung der Gesamtsynthese.

Salzabhängigkeit

Der Einfluß der Salzkonzentration auf die Transkriptionsaktivität in Kernen wurde durch Zugabe steigender Mengen KCl zu den Ansätzen geprüft. Hierbei zeigten KCl-Konzentrationen bis 250mM eine deutliche stimulierende Wirkung (Abb. 4B). höhere Salzkonzentrationen (500 mM) führten zu nicht reproduzierbaren unspezifischen stimulierenden bzw.

hemmenden Effekten. Der Anteil der α -Amanitin sensitiven Polymerase 2 - und α -Amanitin insensitiven Polymerase 1 - Aktivität an der Gesamtsynthese wurde durch die Variation des Ionenmilieus nicht beeinflusst (Abb. 4B).

α - Amanitinsensitiver Anteil der Transkriptionsaktivität

Die drei Klassen eukaryontische RNA - Polymerasen können aufgrund ihrer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber dem Hemmstoff α - Amanitin unterschieden werden (Faulstich, 1980): Die Aktivität von Polymerase 1 wird durch α - Amanitin nicht beeinflusst, Polymerase 2 dagegen wird durch niedrige und Polymerase 3 durch hohe Konzentrationen an α - Amanitin inhibiert. Diese Eigenschaft der Enzyme sollte genutzt werden, um den Anteil der verschiedenen RNA - Polymerasen an der RNA - Synthese in den isolierten Kernen zu bestimmen.

Hierzu wurden Transkriptionsversuche in Anwesenheit steigender Konzentrationen α - Amanitins durchgeführt. Der durch α - Amanitin hemmbare Teil der Gesamtaktivität betrug bei Kernen aus wachsenden Plasmodien 60 - 80 %, dieser Wert wurde nach Zugabe von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ α - Amanitin erreicht (Abb. 4C). Eine weitere Erhöhung der α - Amanitinkonzentration bis zu 10 $\mu\text{g/ml}$ hatte keinen weiteren Einfluß auf die Transkriptionsaktivität, eine für Polymerase 3 typische Hemmung durch hohe Konzentrationen α - Amanitins wurde nicht beobachtet.

Nukleotidabhängigkeit

Zur Prüfung auf interne pools an freien Nukleotiden in den isolierten Kernen wurde die Syntheseaktivität in An- und Abwesenheit exogener Nukleotide bestimmt.

Schon nach ausschließlicher Zugabe von ^3H -UTP (0,17 μM) zu den Reaktionsansätzen war RNA - Synthese nachweisbar. Dies belegt die Existenz nukleärer Nukleotidpools. Die Syntheseaktivität konnte durch Zugabe der drei nicht markierten Nukleotide bis zu einer Konzentration von 75 μM

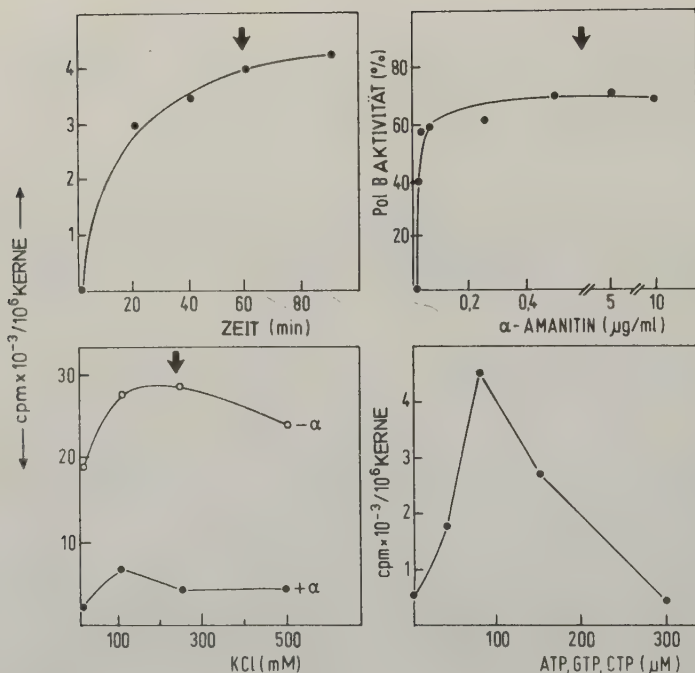


Abb.4 Standardisierung der in vitro Transkriptionsbedingungen. Je 10^6 Kerne wurden in 100 μl Reaktionen für 60min bei 30°C inkubiert. Soweit nicht anders angegeben, enthielten die Ansätze 0.5M Hexylenglycol, 2mM PIPES, 5mM MgCl_2 , 1mM MnCl_2 , 0.5mM DTT, 250mM KCl, je 150mM ATP, GTP,CTP und $0.8\mu\text{Ci } ^3\text{H-UTP}$ (46 Ci/mM). Die RNA - Synthese wurde durch Bestimmung des Einbaus von $^3\text{H-UTP}$ in säurefällbares, alkalilabiles Material gemessen. (a) Kinetik der RNA - Synthese. (b) Abhängigkeit der RNA - Synthese von der KCl - Konzentration in An (●) - bzw. Abwesenheit (o) von α - Amanitin (2 $\mu\text{g/ml}$). (c) Hemmung der RNA - Synthese durch α - Amanitin. (d) Abhängigkeit der RNA - Synthese von der Konzentration exogener Nukleotide.

stimuliert werden (Abb. 4D). Höhere Konzentrationen an ATP, GTP, CTP erniedrigten den ^3H -UTP Einbau. Um eine Limitierung der Aktivität durch die geringen Mengen zugegebenen ^3H -UTPs auszuschliessen, wurde unmarkiertes UTP zugesetzt. Schon niedrige Konzentrationen unmarkierten UTPs (5 μM) erniedrigten den Einbau des markierten Nukleotids durch dessen Verdünnung (Tab. 1a).

Zum Ausschluß einer Limitierung der Syntheseaktivität durch Erschöpfung der Nukleotidpools wurden Reaktionsansätze nach der Hälfte der Inkubationszeit (30 min) mit frischen Nukleotiden versetzt. Diese Erhöhung der Nukleotidkonzentration wirkte wiederum hemmend auf die Gesamtsynthese (Tab. 1b). Diese Ergebnisse weisen auf die Anwesenheit freier Nukleotide in den isolierten Kernen hin und sind ein Indiz dafür, daß unter den gewählten Isolationsbedingungen die Schädigung der Kerne gering gehalten wurde.

	cpm	% Aktivität
(a) Kontrolle	5600	100%
in Anwesenheit von 5 μM UTP	1310	23%
(b) Kontrolle (30 min Inkubation)	1805	75%
(60 min Inkubation)	2390	100%
Zugabe von 75 μM ATP, GTP, CTP		
nach 30 min Inkubation	2045	85%

Tab.1 Nukleotidabhängigkeit der Transkriptionsaktivität in isolierten Kernen

Je 10^6 Kerne wurden, soweit nicht anders angegeben, für 60 min bei 30°C in KM (0,5M Hexylenglycol, 5mM MgCl_2 , 2mM PIPES, 1mM MnCl_2 , 0,5mM DTT) mit 250mM KCl, 75 μM ATP, GTP und CTP und 0,8 μCi ^3H -UTP in 100 μl Volumen inkubiert. Anschließend wurde der Einbau von ^3H -UTP in säurefällbares, alkalilabiles Material bestimmt. (a) Inhibition des ^3H -UTP Einbaus durch Zugabe unmarkierten UTPs (b) Inhibition des ^3H -UTP Einbaus durch Zugabe von ATP, GTP und CTP.

Wahl der Standardbedingungen

Der Vergleich verschiedener Kernpräparationen zeigte große Unterschiede in der Gesamtaktivität, nicht aber in den angeführten Parametern. Nach den oben genannten Ergebnissen wurden im weiteren standardmäßig die folgenden Reaktionsbedingungen für Transkriptionsversuche gewählt: 250 mM KCl, 75 μ M ATP, GTP, CTP, 8 μ Ci / ml 3 H - UTP und Inkubation bei 30°C für 60min. Unter diesen Bedingungen lag die Gesamtaktivität von isolierten Kernen aus wachsenden Plasmodien bei 20 000-40 000 cpm/ 10^6 Kernen, für Kerne aus hungernden Plasmodien bei 3000-8000 cpm/ 10^6 Kerne. Einmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff erniedrigte die Aktivität um 20%, bei Lagerung in flüssigem Stickstoff blieben die Präparate für mindestens 3 Monate stabil. Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen führte zu vollständigem Verlust der Aktivität.

4.2.3 Differenzierungsspezifische Änderungen der Transkriptionsaktivität isolierter Zellkerne

In früheren Untersuchungen war die Induktion einer Vielzahl neuer translatierbarer mRNA - Spezies während der lichtinduzierten Sporulation von *Physarum* gezeigt worden (Putzer et al., 1984). Es sollte daher geprüft werden, ob während der Differenzierung Änderungen der Transkriptionsaktivität in isolierten Zellkernen auftreten.

Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung wurden aus Plasmodien Kerne isoliert. Diese wurden hinsichtlich ihrer Gesamt - und Polymerase 2 - Aktivität untersucht. Wie in Abb. 5 dargestellt, war die Gesamtaktivität während der Phase der Morphogenese deutlich erhöht. Da die α - Amanitin insensitive Aktivität von Polymerase 1 während der Differenzierung konstant blieb, beruhte die Steigerung der RNA - Syntheseaktivität ausschließlich auf einer Aktivierung von Polymerase 2 um 40 - 60% (Abb. 5, Inset). Die zeitliche Korrelation der Stimulierung der Polymerase 2 - Aktivität mit dem Auftreten der sporulations-spezifischen translatierbaren mRNA-Spezies deutet auf die

Neusynthese dieser differenzierungsspezifischen Sequenzen hin.

4.2.4 Isolierung in vitro transkribierter RNA

Das Ziel der weiteren Arbeiten war die Bestimmung der Transkriptionsraten spezifischer Gene. Dies setzt voraus, daß in den Kernen hochmolekulare Transkripte synthetisiert und daß diese anschließend in weitgehend undegradierter Form isoliert werden können. Für die Ermittlung der Größe der isolierten Transkripte wurden Transkriptionsreaktionen in Gegenwart von 50-250 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{32}P - UTP durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch zweimalige Extraktion mit Phenol beendet, die RNA anschließend in Anwesenheit von 10 μg Hefe tRNA durch Zugabe von 3 Vol. Ethanol ausgefällt. Freie Nukleotide wurden mittels Chromatographie über eine Sephadex G 50 Säule aus der Lösung abgetrennt. Die Größe der gereinigten Transkripte wurde durch Elektrophorese in denaturierenden Agarose / Formaldehydgelen bestimmt. Wie in Abb. 6 dargestellt, konnten nach Zusatz placentalen RNaseinhibitors (RNasin) aus frisch isolierten Kernen hochmolekulare Produkte isoliert werden. Diese Wirkung des RNasins wurde nur bei Verwendung frischer, nicht aber bei eingefrorenen Kernpräparaten beobachtet. Die anschließenden Versuche zur spezifischen Transkription wurden daher ausschließlich mit frisch isolierten Zellkernen und in Anwesenheit von RNasin durchgeführt.

4.2.5 Nachweis der spezifischen Transkription Polymerase 2 - abhängiger Gene

Zum Nachweis spezifischer Sequenzen in der in vitro transkribierten RNA dienen Hybridisierungen gegen geeignete clonierte DNA - Sequenzen. Eine Methode, die auch mit heterologen Hybridisierungsproben eine qualitative Analyse spezifischer Transkripte ermöglicht, ist die Hybridisierung radioaktiv markierter Transkripte gegen filtergebundene DNA - Sequenzen (dot - blot Verfahren). Diese Technik wurde für die folgenden Transkriptionsstudien optimiert.

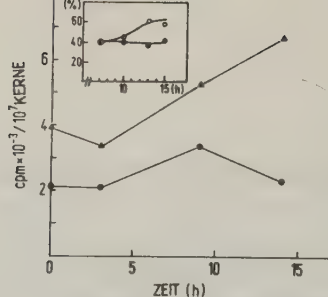


Abb. 5 Zunahme der Polymerase 2 - Aktivität während der Sporangienbildung. In vier Differenzierungsstadien wurden Kerne aus Plasmodien isoliert und die Proben geteilt. Anschließend wurde die RNA - Synthese unter Standardbedingungen in An (●) - bzw. Abwesenheit (▲) von α - Amanitin (1 μ g/ml) gemessen. Maß für die Transkriptionsaktivität war der Einbau von ^3H - UTP in säurefällbares, alkalilabiles Material.

Inset: Zunahme der Polymerase 2 - Aktivität in isolierten Kernen sporulierender Plasmodien (○) (% der Gesamtaktivität) im Vergleich zur Aktivität in nichtinduzierten Kernen (●).

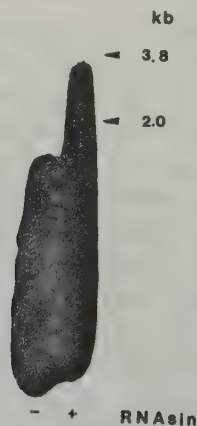


Abb. 6 Größe der isolierten in vitro Transkripte. Transkriptionsreaktionen wurden mit frisch isolierten Kernen (100 μ l, 20 μ Ci ^{32}P - UTP) in An - bzw. Abwesenheit des RNaseinhibitors RNasin (200 U/ml) durchgeführt. Nach Ende der Inkubation wurde die synthetisierte RNA nach zweimaliger Extraktion mit Phenol isoliert und durch Chromatographie über eine Sephadex G - 50 Säule (1 ml) von freien Nukleotiden abgetrennt. Anschließend wurde die radioaktive RNA (30 000 cpm pro Probe) in einem 1,5%igen denaturierenden Agarose / Formaldehydgel elektrophoretisch getrennt.

Für die Standardisierung der Versuchsbedingungen standen als spezifische Hybridisierungsproben die folgenden Plasmide zur Verfügung: pPHR II, das ein 2.8 kb Fragment der *Physarum* - rDNA enthält, als Probe für Polymerase 1 - abhängige rDNA Transkription und pDr 88F, das ein komplettes *Drosophila* - Aktin Gen enthält, als Probe für ein Polymerase 2 transkribiertes Gen. Als Kontrolle für unspezifische Hybridisierung wurde in diesen Versuchen DNA des Vektors pBR322 verwendet.

In vitro Transkripte wurden in 200 μ l Reaktionen mit 2 - 6 $\times 10^6$ Kernen in Anwesenheit von 50 μ Ci 32 P-UTP unter Standardbedingungen hergestellt. Die gesamte aus einer Reaktion isolierte RNA ($0.4 - 1.4 \times 10^6$ cpm) wurde in 900 μ l Volumen für eine Hybridisierungsreaktion eingesetzt. Hybridisierungs - und Waschbedingungen wurden wie für Northern - blot Hybridisierungen beschrieben gewählt.

Die Hybridisierung der in vitro transkribierten RNA gegen steigende Mengen filtergebundener Plasmid - DNA zeigte im analysierten Bereich (0,2 - 8 μ g DNA pro dot) eine lineare Abhängigkeit der spezifisch gebundenen Radioaktivität von der eingesetzten DNA - Menge (Abb. 7A). Die Kinetik der Hybridisierung ergab im analysierten Bereich (1 - 3 Tage Hybridisierungsdauer) für ribosomale Transkripte eine lineare Abhängigkeit der gebundenen Radioaktivität von der Hybridisierungsdauer. Die aktinspezifische gebundene Radioaktivität dagegen durchlief nach zwei Tagen Hybridisierungsdauer (Abb. 7B) ein Maximum. Eine anschließende zweite Hybridisierung der eingesetzten RNA gegen frische dot - blot Filter mit identischen DNA - Proben ergab erneut ein - wenn auch schwächeres - Hybridisierungssignal. Dies belegt, daß sowohl ribosomale als auch Aktinsequenzen aus den isolierten Transkripten abgereichert wurden, eine quantitative Bindung an die dot - blot Filter wurde jedoch nicht erhalten.

Zum Nachweis der Polymerase 2 - Abhängigkeit der Aktintranskription wurden Transkriptionsreaktionen in Anwesenheit von 1 μ g / ml α -Amanitin durchgeführt. Abb 8A

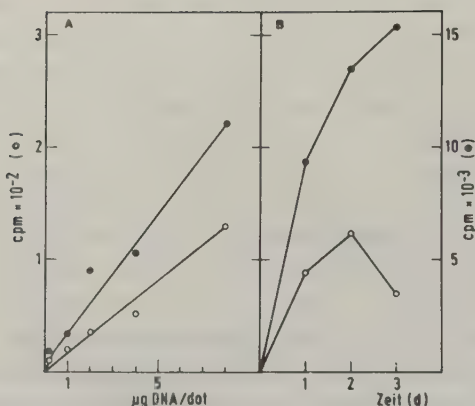


Abb.7 Standardisierung der dot - blot Hybridisierung. Isolierte Kerne aus je einem Plasmodium wurden unter Standardbedingungen ($50\text{uCi } ^{32}\text{P} - \text{UTP}$, 200ul) inkubiert. Die in vitro transkribierte RNA wurde anschließend gegen filtergebundene Plasmid DNA hybridisiert (42°C , 50% Formamid, 5xSSC, 5xDenhardts, 0,1% SDS, 1% Sarcosyl, 1xPB (120mM Natrium - Phosphatpuffer, pH 7.2)). Die Filter wurden mit 1xSSC, 1xPB bei 50°C gewaschen, die gebundene Radioaktivität nach Auflösen der Filter in 3ml Szintillator durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. (A) Abhängigkeit des Hybridisierungssignals von der Menge filtergebundener DNA (Hybridisierungsdauer 2 Tage). (B) Abhängigkeit des Hybridisierungssignals von der Hybridisierungsdauer ($4\mu\text{g DNA pro dot}$). Verwendete Plasmid DNA: pFHR II (*Physarum* rDNA) ($\bullet$), pDR 88F (*Drosophila* Aktin) ($\circ$).

zeigt die dot blot Analyse der daraus isolierten RNA. In Transkripten, die in Anwesenheit des Polymerase 2 Inhibitors synthetisiert worden waren, konnten in der Hybridisierung keine aktinspezifischen Sequenzen nachgewiesen werden.

Eine Verstärkung des Signals wurde durch Verwendung einer spezifischeren Hybridisierungsprobe erhalten. Abb. 8B zeigt dot blot Hybridisierungen, bei denen das Gesamtplasmid pDr 88F bzw ein daraus isoliertes 760 bp Fragment aus der codierenden Region des *Drosophila* - Aktins in äquimolarer Menge als Hybridisierungsprobe verwendet wurde. Da die Verwendung der spezifischen Probe aus der codierenden Aktinsequenz eine deutliche Verstärkung des Signals bewirkt, wurden im weiteren zur Analyse Polymerase 2 - abhängiger Transkripte spezifische Hybridisierungsproben aus der codierenden Sequenz der jeweiligen Gene verwendet.

Für die weiteren Studien schien es wünschenswert, die qualitativen Aussagen auf eine quantitative Abschätzung der Signale zu erweitern. Hierzu wurde die Aktin und α - Tubulintranskription in wachsenden und hungernden Plasmodien verglichen. Da ein konstitutiv exprimiertes Polymerase 2 Gen als interner Standard für die Quantifizierung der Transkripte nicht zur Verfügung stand, wurde die Aktivität der Polymerase 1 (Hybridisierung an pPHR II) als Bezugswert zugrunde gelegt. Dieser Ansatz erschien sinnvoll, da die Konstanz der Polymerase 1 - Aktivität in der S - und G2 - Phase des Zellcyclus (Davies & Walker, 1977), sowie in hungernden und sporulierenden Plasmodien (siehe 4.2.3) gezeigt worden war. Nach Hybridisierung und Autoradiographie der dot - blot Filter wurden die einzelnen Proben ausgestanzt, in Szintillator aufgelöst und die gebundene Radioaktivität mittels Flüssigszintillationszählung ermittelt. Die erhaltenen Daten wurden anschließend auf die pPHR II - spezifische gebundene Radioaktivität normiert. Mit Hilfe dieser Methodik konnten Unterschiede in der relativen Transkriptionsaktivität Polymerase 2 - abhängiger Gene in verschiedenen Entwicklungsstadien gezeigt werden. So zeigen die in Abb. 9 dargestellten dot blot Hybridisierungen einen

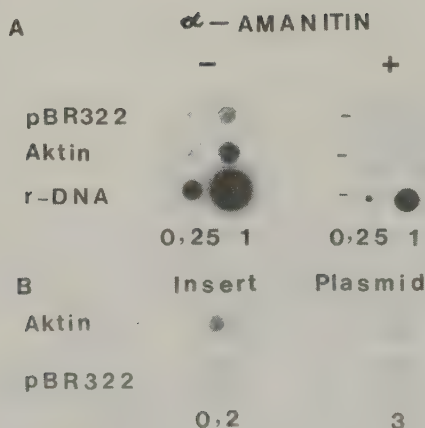
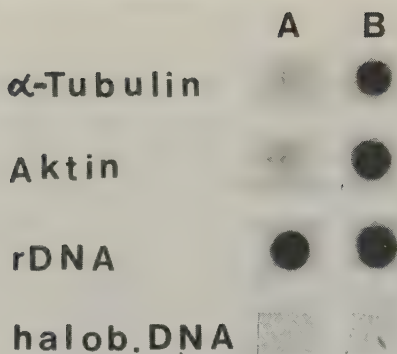


Abb.8 Transkription von Aktinsequenzen in isolierten Kernen. (A) Polymerase 2 - Abhängigkeit der Aktintranskription. Isolierte Kerne aus wachsenden Plasmodien wurden unter Standardbedingungen (50uCi ^{32}P - UTP, 200ul) in An - bzw. Abwesenheit von α - Amanitin (1ug/ml) inkubiert. Die isolierten Transkripte wurden für zwei Tage gegen filtergebundene Plasmid DNA von pDR 88F (Aktin), pBR 322 und pPHR II (rDNA) hybridisiert, gewaschen und auf Röntgenfilm exponiert. (B) Verstärkung des Hybridisierungssignals. In vitro Transkripte wurden gegen 3ug filtergebundener DNA des Plasmides pDR 88F bzw. gegen die äquimolare Menge (0,2ug) eines daraus isolierten 760 bp Fragmentes aus der für Aktin - codierenden Region hybridisiert, gewaschen und exponiert.

Vergleich der α - tubulin und aktinspezifischen Transkriptionsaktivität in isolierten Kernen aus wachsenden bzw. hungernden Plasmodien. Eine Auswertung der Hybridisierungen nach Flüssigszintillationszählung der gebundenen Radioaktivität ergab, bezogen auf die Aktivität der Polymerase 1, eine drei - bzw. vierfache Stimulation der α - Tubulin - bzw. Aktintranskription in hungernden Zellen (Abb. 9).

4.3 Regulation der Aktin - und Tubulin mRNA Synthese

Die Konzentration einer mRNA kann auf Ebene der Transkription, der Prozessierung des Primärtranskriptes oder der Stabilisierung der mRNA reguliert werden. Eine Unterscheidung zwischen diesen Möglichkeiten setzt die Kenntnis der zeitlichen Veränderungen der mRNA Konzentration voraus. Diese kann für translatierbare mRNA - Spezies mit der oben beschriebenen Methode der in vitro Translation (4.1.1) analysiert werden. Einen direkten Beleg für die An - bzw. Abwesenheit einer mRNA bietet die Hybridisierung gegen eine klonierte DNA - Sequenz. Hierfür wird zelluläre RNA in denaturierenden Agarosegelen nach Größe getrennt und auf Nitrozellulose übertragen (Northern - blot). Nach anschließender Hybridisierung der fixierten RNA gegen eine durch nick - translation radioaktiv markierte Hybridisierungsprobe und Autoradiographie werden homologe RNA - sequenzen aufgrund der spezifischen Bindung der markierten DNA nachgewiesen. Für die Untersuchung der Aktin mRNA wurden heterologe Hybridisierungsproben verwendet. Die spezifische Hybridisierung klonierter Hefe - und *Drosophila* - Aktogene mit *Physarum* - Aktinsequenzen war bei der Analyse der Organisation der Aktinogenfamilie in *Physarum* gezeigt worden (Schedl & Dove, 1982). Zum Nachweis der Spezifität der benutzten Probe wurde Aktin mRNA hybridselektioniert, in vitro translatiert und die Identität des Translationsprodukts mit Aktin geprüft (nicht gezeigt).



	cpm/Filter		cpm/cpm pPHR II	
	A	B	A	B
α - Tubulin	24	81	0,15	0,5
Aktin	31	129	0,19	0,8
rDNA	162	160	1	1

Abb.9 Stadienspezifische Unterschiede in der relativen Transkriptionsrate von aktin - und tubulinspezifischen Sequenzen. Isolierte Kerne aus einem wachsenden (A) bzw. hungernden (B) Plasmodium wurden unter Standardbedingungen ($70\mu\text{Ci } ^{32}\text{P}$ - UTP, $200\mu\text{l}$) inkubiert. Die isolierten Transkripte wurden für zwei Tage gegen je $0,1\mu\text{g}$ filtergebundener DNA des Plasmids pPHR II (rDNA), bzw. der Plasmid - Inserts von pPc α 125 (α - Tubulin) und pDR 88F (Aktin) hybridisiert. Als Kontrolle wurde halobakterielle DNA verwendet. Die Filter wurden gewaschen und auf Röntgenfilm exponiert. Anschließend wurden die einzelnen dots ausgestanzt, in Szintillator aufgelöst und die gebundene Radioaktivität mittels Flüssigszintillationszählung bestimmt. In der Tabelle sind die korrigierten Werte für die spezifisch gebundene Radioaktivität und die Normierung auf die spezifische Bindung an pPHR II (Polymerase 1 - Aktivität) angegeben.

4.3.1 Zeitliche Regulation der Aktin - und Tubulin mRNA Konzentration

Aktin

Der zeitliche Verlauf des Verlustes an Aktin mRNA wurde mit beiden Methoden näher analysiert. Hierzu wurde aus lichtinduzierten Plasmodien verschiedener Differenzierungsstadien Gesamt - RNA isoliert und im Retikulozytensystem translatiert. Die in vitro synthetisierten Proteine wurden anschließend durch Elektrophorese in einem 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und fluorographiert. Die densitometrische Auswertung des Fluorogramms zeigte den nahezu vollständigen Verlust an translatierbarer Aktin mRNA zum Zeitpunkt 12 Stunden nach Belichtungsbeginn, dem Beginn der Morphogenese (Abb. 10 und 11B). In Übereinstimmung mit diesem Befund ergaben Northern - blot Hybridisierungen der Gesamt - RNA gegen ein cloniertes *Drosophila* - Aktin (pDR 88F, Sanchez et al., 1983) das Verschwinden der 1,6 kb Aktin mRNA Bande zum gleichen Zeitpunkt (Abb. 11). Die in dem dargestellten Autoradiogramm erkennbaren höhermolekularen Banden beruhen auf unspezifischer Hybridisierung der *Drosophila* DNA mit rRNA. Dies konnte durch Kontrollhybridisierungen der an Nitrocellulose gebundenen zellulären RNA gegen das Plasmid pPHR 102, das die Gene der ribosomalen 19S und 26S RNA enthält, gezeigt werden.

Tubulin

In früheren Arbeiten war die Induktion von zwei Tubulinen und den korrespondierenden translatierbaren Tubulin mRNA Spezies während der Sporulation von *Physarum* Plasmodien gezeigt worden (Putzer et al., 1984). Dieser qualitative Befund sollte durch eine Analyse der zeitlichen Regulation und den direkten Nachweis der Tubulin mRNA mittels Northern - blot Hybridisierungen erweitert werden. Hierfür wurde Gesamt - und poly A RNA aus Zellen verschiedener Differenzierungsstadien gegen eine homologe α - Tubulin cDNA (pPc α 125. Schedl et al., 1984) hybridisiert. Das

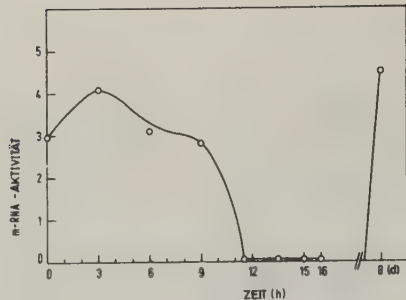


Abb.10 Verlust translatierbarer Aktin mRNA - Sequenzen während der Sporulation. Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung wurde aus Plasmodien Gesamt RNA isoliert. Je 0.5µg der RNA wurden in Reticulocytenlysat translatiert, die Translationsprodukte in einem 10%igen SDS - Polyacrylamidgel fraktioniert und fluorographiert. Die 42kD - Bande des Fluorogramms (siehe Abb.11) wurde densitometrisch ausgewertet.

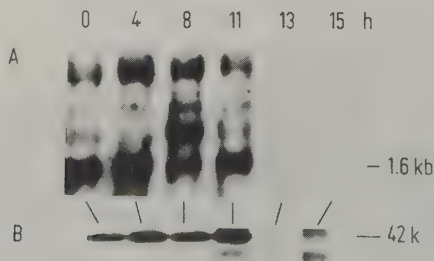


Abb.11 Verlust der 1.6kb Aktin mRNA während der Sporulation. (A) Je 25µg isolierter Gesamt RNA aus Plasmodien der angegebenen Differenzierungsstadien wurde in einem 1.5%igen denaturierenden Agarose / Formaldehydgel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und gegen das radioaktiv markierte 4.8kb große Insert des Plasmids pDR 88F (*Drosophila* 88F Aktigen) hybridisiert. Die markierte 1.6kb Bande entspricht der Aktin mRNA, die hohermolekularen Banden beruhen auf unspezifischer Hybridisierung mit rRNA, wie durch Kontrollhybridisierung gezeigt werden konnte (siehe Text). (B) 0.5µg der RNAproben wurden zellfrei translatiert, die Translationsprodukte in einem 10%igen SDS - Polyacrylamidgel aufgetrennt und fluorographiert. Die 42kD Bande des radioaktiven Aktins ist dargestellt.

Autoradiogramm in Abb. 12 zeigt die spezifische Hybridisierung der cDNA Probe mit einer etwa 1,9 kb grossen RNA Spezies. Die Anreicherung dieser RNA in der poly A - Fraktion der RNA (Abb. 12. rechts) weist darauf hin, daß es sich um eine polyadenylierte mRNA Sequenz handelt. Die Konzentration der α - Tubulin mRNA zeigt zwei Maxima zu den Zeitpunkten 11 und 17 Stunden nach Induktionsbeginn. Nach Durchlaufen des 11 Stunden Maximums war das Molekulargewicht der mRNA geringfügig verringert. Eine ähnliche Größenverschiebung der α - Tubulin mRNA wurde bei Untersuchungen zur Tubulinregulation im Zellcyclus beobachtet (Schedl et al., 1984). Sie erfolgt hier im Anschluß an das Konzentrationsmaximum der mRNA zum Zeitpunkt der Mitose. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die differenzierungsspezifische Induktion der Tubulin Synthese auf der transienten Stimulierung der mRNA Synthese beruht. Analoge Hybridisierungen mit der β - tubulinspezifischen heterologen cDNA pT₂ (Valenzuela et al., 1981) lieferten aufgrund der geringen Spezifität dieser Probe keine eindeutigen Resultate.

4.3.2 Transkription von Aktin und Tubulin in vitro

Die differenzierungsspezifische Änderung der Aktin - und Tubulin mRNA Konzentrationen machten eine Regulation auf Ebene der mRNA - Synthese wahrscheinlich. Um eine mögliche Transkriptionskontrolle nachzuweisen bzw. auszuschliessen, wurde die Transkriptionsaktivität von Aktin - und Tubulingenen in isolierten Kernen analysiert. Hierzu wurden in verschiedenen Differenzierungsstadien die Kerne aus je einem Plasmodium isoliert und in Transkriptionsreaktionen eingesetzt. Die isolierte in vitro transkribierte RNA wurde anschließend mittels dot - blot Hybridisierung auf ihren Gehalt an aktin - und tubulinspezifischen Sequenzen untersucht. Als Hybridisierungsproben wurden für Aktin das 760 bp Bgl II / Kpn I Fragment der codierenden *Drosophila* Aktinsequenz aus pDR 88F und für α - Tubulin das 800 bp Bgl II / Sac I Fragment der homologen cDNA pP α 125 verwendet. In die Analyse eingeschlossen wurden zusätzlich zwei noch

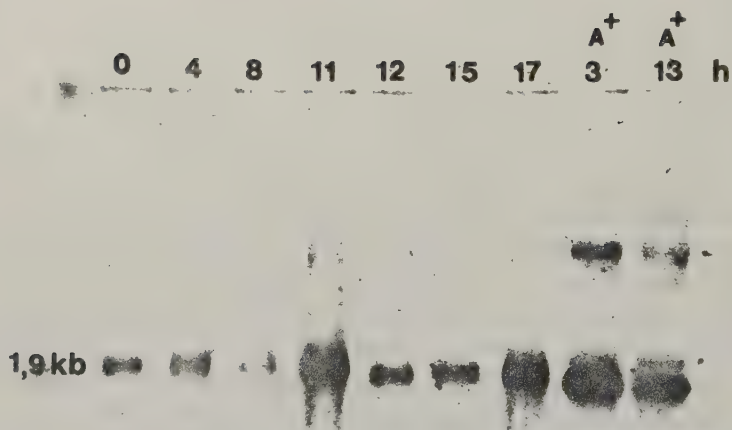


Abb.12 Induktion der α - Tubulin mRNA während der Sporulation. Je 25 μ g isolierter Gesamt RNA aus Plasmodien der angegebenen Differenzierungsstadien wurden in einem denaturierenden 1.5%igen Agarose / Formaldehydgel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und gegen ein radioaktiv markiertes 800bp Fragment der α - Tubulin cDNA pP α 125 hybridisiert.

unvollständig charakterisierte Restriktionsfragmente des rekombinanten EMBL 4 Phagen λ 40, die möglicherweise β - tubulinspezifische Sequenzen enthalten (β 40 - 1 und β 40 - 2, siehe Kap. 4.4.3. und Abb. 17). Als interner Standard der Hybridisierung diente die Bindung Polymerase 1 - abhängiger Sequenzen an das Plasmid pPHR II (vgl. 4.2.5.), als Kontrolle für unspezifische Hybridisierung wurde halobakterielle DNA verwendet. Das Autoradiogramm einer derartigen Hybridisierung ist in Abb. 13 dargestellt. Die qualitative Auswertung des Autoradiogramms zeigt die kontinuierliche Transkription aktinspezifischer Sequenzen. Ebenfalls nachweisbar ist die Transkription von α - tubulin - und β 40 - 1 spezifischen Sequenzen, wohingegen mit β 40 - 2 keine Hybridisierung erhalten wurde (nicht gezeigt).

Zur semiquantitativen Analyse der Transkriptionsaktivität der jeweiligen Gene in verschiedenen Differenzierungsstadien wurden die einzelnen dot blots im Anschluß an die Autoradiographie ausgestanzt und die gebundene Radioaktivität mittels Flüssigszintillationszählung bestimmt. Die erhaltenen Werte für die spezifisch gebundene Radioaktivität der Polymerase 2 - abhängigen Gene wurde dann auf die Polymerase 1 - Aktivität (Bindung an pPHR II) normiert wie oben beschrieben (vgl. 4.2.5; Tab. 2). Die graphische Darstellung dieser Auswertung zeigt Abb. 13. Sie ergibt für die Transkription von Aktin eine deutliche transiente Reduktion der Aktivität zum Zeitpunkt der frühen Morphogenese (12 h p.i.). Dies entspricht dem Zeitpunkt, an dem der Verlust an zellulärer Aktin mRNA beobachtet wurde. Die anschließende Stimulation der Aktintranskription (15 h p.i.) erfolgt zu einem Zeitpunkt, an dem mRNA - Sequenzen nicht nachgewiesen werden konnten. Die Transkription von α - Tubulin und der β 40 - 1 spezifischen Sequenz zeigt zwei deutliche Maxima in der frühen und späten Phase der Differenzierung (0 bzw. 7h und 15 h p.i.). Obwohl die Kerne aus Zellen der Differenzierungsstadien isoliert worden waren, in denen eine erhöhte α - Tubulin mRNA Konzentration gezeigt werden konnte (10 bzw. 12 h p.i.), wurde eine

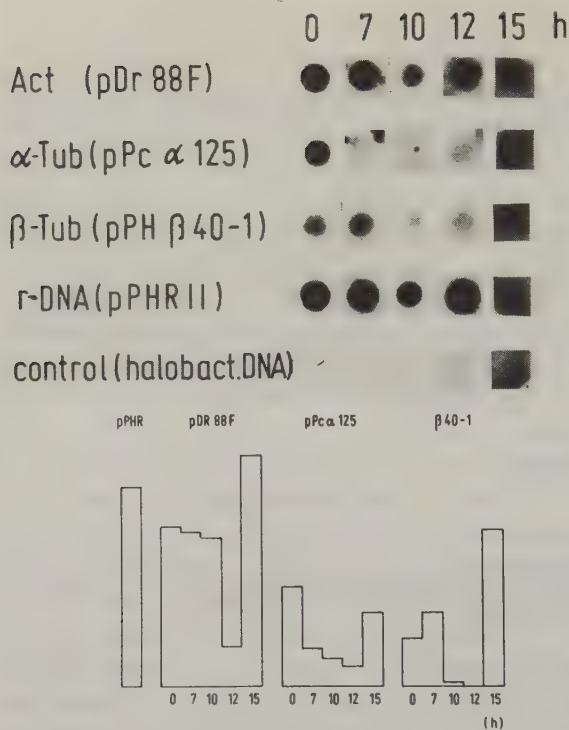


Abb.13 Transkription von aktin - und tubulinspezifischen Sequenzen während der Sporulation. Zu den angegebenen Zeitpunkten während der Sporulation wurden die Kerne je eines Plasmodiums isoliert und unter Standardbedingungen inkubiert. Für die Analyse der Aktin und Tubulintranskription wurde die isolierte in vitro transkribierte RNA gegen je 0.1 μ g filtergebundene DNA der Plasmidinserts aus pPc α 125 (α Tubulin) und pDR 88F (Aktin), sowie gegen ein β tubulin-spezifisches Fragment des Phagen $\lambda\beta$ 40 (β 40 - 1, siehe 4.4.3.) hybridisiert. Als Maß für die Polymerase 1 - Aktivität diente das Plasmid pPHR II, als Kontrolle DNA aus *Halobacterium halobium*. Anschließend wurden die Filter gewaschen und autoradiographiert. Die dots wurden einzeln ausgestanzt, in Szintillator gelöst und zur Ermittlung der spezifisch gebundenen Radioaktivität szintillationsgezählt (Tab.3). Die erhaltenen Werte wurden auf die Polymerase 1 - Aktivität (Bindung an pPHR II) normiert. Die so errechneten relativen Transkriptionsraten der Polymerase 2 - abhängigen Gene wurden in der Graphik aufgetragen.

rDNA	Aktin		α - Tubulin		β - Tubulin	
cpm	cpm	cpm/rDNA	cpm	cpm/rDNA	cpm	cpm/rDNA
160	129	0,8	81	0,5	38	0,24
91	71	0,78	17	0,19	34	0,37
44	33	0,75	6	0,14	--	--
210	42	0,2	21	0,1	--	--
73	85	1,16	27	0,37	57	0,78

Tab.2 in vitro Transkription von Aktin und Tubulin in der Sporulation. Quantifizierung des Versuchs in Abb. 13. Die dot - blot Hybridisierungen wurden ausgestanzt, in Szintillator aufgelöst und die gebundene Radioaktivität mittels Flüssigszintillationszählung bestimmt.

Stimulation der Transkription nicht beobachtet. Demgegenüber könnte die Stimulation der Tubulintranskription 15h p.i. dem späten mRNA Maximum entsprechen.

Da eindeutige Aussagen über die Regulation der Tubulin mRNA aus den obigen Experimenten nicht möglich waren, sollten ähnliche Analysen zur Tubulinexpression im Zellcyclus wachsender Zellen durchgeführt werden. Die Grundlage hierfür bilden Befunde, die eine Zellcyclusabhängigkeit der Tubulin mRNA Konzentration belegen (Schedl et al., 1984). Analog zur Untersuchung der Lichtinduktion der Tubuline wurde daher die zellcyclusregulierte Expression der Tubulingene studiert. Hierzu wurden aus Plasmodien in vier verschiedenen Zellcyclusphasen Kerne isoliert und analysiert wie oben beschrieben. Das Ergebnis eines derartigen Experimentes zeigt Abb. 14. Sie belegt eine kontinuierliche Transkription der α -tubulin und der β 40 - 1 spezifischen Sequenzen im Zellcyclus, die 3 Stunden vor bzw. 1,5 Stunden nach Mitose leicht erhöht war. Parallel zu den Transkriptionsversuchen wurde aus Aliquots der für die Kernisolierung verwendeten Plasmodien Gesamt-RNA isoliert und in Northern-blot Hybridisierungen auf ihren Gehalt an α -Tubulin mRNA untersucht. Das Autoradiogramm in Abb. 14 zeigt eine deutliche Erhöhung der 1,9 kb α -Tubulin mRNA Konzentration zu den Zeitpunkten 3 Stunden vor - bzw. 1,5 Stunden nach Mitose. Dies korreliert mit der beobachteten Stimulation der Tubulintranskription zu diesen Zeitpunkten. Die in Abb. 14 sichtbaren höhermolekularen hybridisierenden Sequenzen stellen eine unspezifische Hybridisierung der cDNA mit rRNA dar, wie in Kontrollhybridisierungen gezeigt werden konnte. Die Korrelation zwischen der Erhöhung der mRNA Konzentration und der geringen Stimulation der Tubulintranskription ist ein Hinweis auf eine mögliche Transkriptionskontrolle dieses Gens. Die Intensität der dot blot Hybridisierungssignale war jedoch zu gering um eine exakte Quantifizierung zu erlauben. Eine Analyse differentieller Unterschiede in der Transkriptionsrate erfordert daher die Etablierung sensitiverer Nachweisverfahren (siehe Diskussion). Diese

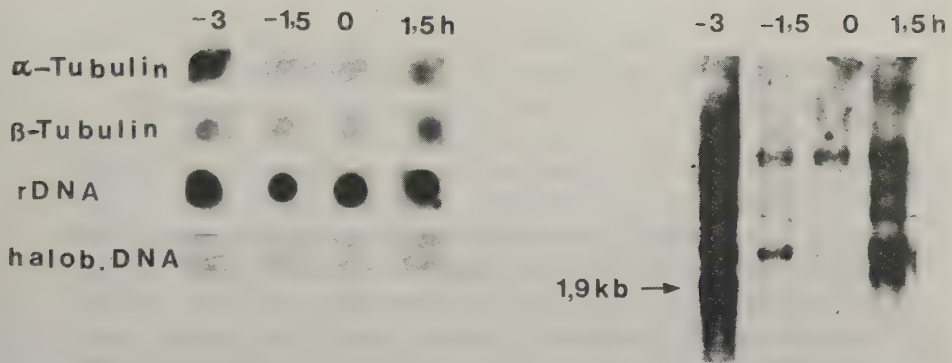


Abb.14 Tubulintranskription im Zellcyclus. Zu vier verschiedenen Zeitpunkten während des Zellcyclus wurden die Kerne je eines Plasmodiums isoliert und unter Standardbedingungen transkribiert. Die synthetisierte RNA wurde gegen je 0,1 μ g des Plasmidininserts aus pPc α 125 (α - Tubulin) und eines DNA - Fragmentes des Phagen λ B 40 (β - Tubulin, siehe 4.4.3.) sowie gegen 0,1 μ g pPHR II DNA (rDNA) hybridisiert. Die Filter wurden im Anschluß an die Hybridisierung gewaschen und autoradiographiert. Aus einem Aliquot der Plasmodien (etwa 10% der Zellmasse) wurde Gesamt RNA isoliert. Je 10 μ g der RNA wurden in einem 1.5%igen Agarose / Formaldehydgel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und gegen das radioaktiv markierte 800bp Insert des α - Tubulinspezifischen Plasmids pPc α 125 hybridisiert. Die angegebenen Zeiten geben die Zeiten relativ zur Mitose (0h) an.

setzen die Bereitstellung homologer genomischer charakterisierter Sequenzen in clonierter Form als Hybridisierungsproben voraus.

4.4 Clonierung genomischer Tubulinsequenzen aus *Physarum*

4.4.1 Konstruktion einer genomischen Genbank im λ - Phagen EMBL - 4

Kern DNA aus *Physarum* wurde mit dem Restriktionsenzym Sau 3A partiell gespalten. DNA Fragmente einer Größe von etwa 12 bis 18 kb wurden fraktioniert isoliert und mit Bam H1 restringierter, dephosphorylierter Vektor DNA ligiert. Die ligierte DNA wurde in vitro verpackt. Aliquots des verpackten Materials wurden auf infektiöse Partikel getestet. Hierbei zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Verpackungseffizienz von der Größe der inserierten *Physarum* DNA Fragmente. Die Ausbeute an infektiösen Phagen lag nach Verpackung rekombinanter DNA mit etwa 12 kb grossen Inserts bei 7×10^4 pfu / μ g, bei Inserts von 16 bis 18 kb bei $1 - 2 \times 10^4$ pfu / μ g.

Zur Amplifikation der Phagen wird üblicherweise der *E.coli* Stamm Q359(P2) verwendet. Der Vorteil dieses Stammes besteht in der selektiven Vermehrung der rekombinanten Phagen. Diese Selektivität beruht auf einer Interferenz (spi - Selektion) des in Q359 inkorporierten lysogenen Phagen P2 mit dem Vektors EMBL 4. Diese bewirkt eine Hemmung des lytischen Vermehrungszyklus des Vektors. Bei der Clonierung wird der Teil des Vektorgenoms, der die regulatorischen Gene enthält, durch FremdDNA ersetzt, sodaß die Rekombinanten keiner Hemmung des lytischen Zyklus unterliegen.

Nach Plattierung der Phagen auf dem selektiven Wirtsstamm Q 359 wurden sehr kleine Plaques erhalten. Daher wurde dieser Stamm im weiteren nur für Probeplattierungen verwendet, während die weitere Analyse der Phagen mit dem nicht - selektiven Wirtsstamm Q 358 durchgeführt wurde. Die

Testplattierung der verpackten Phagen auf den beiden Wirtsstämmen ergab einen Anteil von 80% an rekombinanten Phagen. 20% besaßen den spi^+ - Phänotyp des Vektors.

4.4.2 Isolierung tubulin - spezifischer Clone

Bei einer durchschnittlichen Länge der inserierten DNA von 14 kb und der Genomgröße *Physarums* von 2×10^5 kb ist in 98 000 Clonen mit 99.9% Wahrscheinlichkeit eine singuläre Sequenz einmal repräsentiert (Maniatis et al., 1982). Für die Isolierung der tubulin - spezifischen Clone wurden 120 000 Plaques analysiert. Als Hybridisierungsprobe dienten ein 800 bp Fragment einer homologen α - Tubulin cDNA (pP α 125, Schedl, 1984) und ein 900 bp Fragment einer heterologen β - Tubulin cDNA aus Hühnerhirn (pT $_2$, Valenzuela et al., 1981). Für die Plaquehybridisierung wurden ca. 3×10^3 rekombinante Phagen pro Petrischale ausplattiert. Zur Identifizierung tubulinspezifischer Clone wurden die Plaques auf Nitrozellulose transferiert und mit den klonierten Proben hybridisiert. Plaques, die in der ersten Hybridisierung positive Signale ergaben wurden isoliert und zur Vereinzelung der Rekombinanten erneut plattiert und hybridisiert. Nach der zweiten Hybridisierung ergaben etwa 20 bis 70 % der aus einem primären Isolat erhaltenen Plaques positive Signale. Nach Reisolation positiver Clone wurde die Prozedur wiederholt, bis alle Plaques eines Isolates positive Hybridisierungssignale gaben. Als Beispiel für die Isolierung eines rekombinanten Phagen ist in Abb. 15 die erste und die letzte Hybridisierung des β - tubulinspezifischen Clons $\lambda\beta$ 40 dargestellt.

4.4.3 Charakterisierung der rekombinanten Phagen $\lambda\alpha$ 43 und $\lambda\beta$ 40

Für weitere Untersuchungen wurden aus den isolierten positiven Clonen der α - tubulinspezifische Clon $\lambda\alpha$ 43 und der β - tubulinspezifische Clon $\lambda\beta$ 40 ausgewählt. Diese sollten durch Restriktionsanalyse der DNA und Hybridisierung der Restriktionsfragmente gegen die tubulinspezifischen

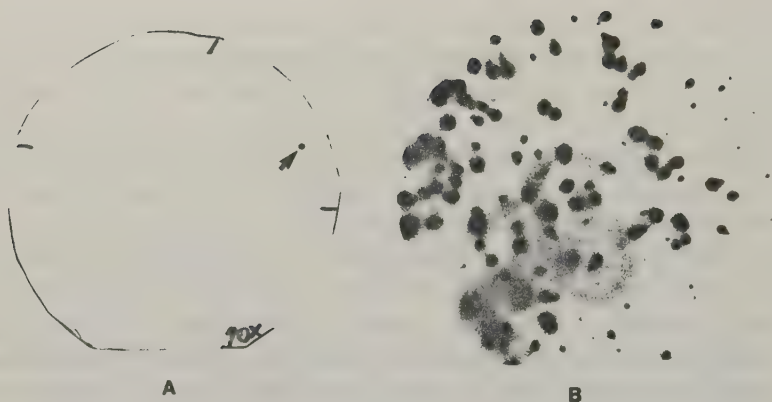


Abb.15 Plaquehybridisierung der EMBL 4 Genbank mit der β - tubulinspezifischen cDNA pT₂ aus Hühnerhirn. (A) Erste Hybridisierung, ca. 3×10^3 Plaques pro Petrischale wurden plattiert und auf Nitrocellulose übertragen. Die Filter wurden 40 Stunden bei 42°C mit 5×10^4 cpm/ml des ^{32}P markierten Plasmidinerts hybridisiert, mit 1xSSC, 50mM Tris - HCl pH 7.5 bei 40°C gewaschen und autoradiographiert. Für anschließende Screens wurde der hybridisierende Plaque (Pfeil) in einem Agarblock (2mm $\varnothing$) isoliert und in 500ul 50mM Tris - HCl, pH 7.5, 10mM NaCl, 8mM MgSO₄ überführt. Aliquots der erhaltenen Phagenlösung wurden erneut plattiert und hybridisiert. (B) Letzte Hybridisierung des isolierten Rekombinanten, alle auf der Platte sichtbaren Plaques gaben in der Hybridisierung positive Signale.

Proben charakterisiert werden. Bei der Restriktion der Phagen DNA wurde mit 10 bis 20 fachem Enzymüberschuß gearbeitet, um die Vollständigkeit der Verdaus sicherzustellen. Unter diesen Bedingungen wurde mit verschiedenen Enzymen das Auftreten substöchiometrischer DNA - Fragmente beobachtet. Die Verwendung von Enzymen verschiedener Hersteller sowie eine Veränderung der Restriktionsbedingungen (Enzymkonzentration und Inkubationsdauer) hatte keinen Einfluß auf die erhaltenen Restriktionsmuster. Als Beispiel zeigt Abb. 16 die Restriktionsmuster des Clons $\lambda\alpha$ 43 nach Restriktion mit dem Enzym Bam H1 unter verschiedenen Bedingungen sowie die Hybridisierung der Fragmente mit dem α - tubulinspezifischen Plasmid pPc α 125. Eine mögliche Ursache für das Auftreten substöchiometrischer Fragmente bei Restriktion der Phagen DNA ist die Entstehung unterschiedlicher Subpopulationen eines Clones aufgrund der Instabilität der *Physarum* DNA in bakteriellen Wirten (Nader et al., 1985). Auf die Kartierung der λ Clone wurde aufgrund der Heterogenität des Materials verzichtet. Statt dessen wurden im weiteren Enzyme gesucht, die die Isolierung eindeutig definierter Fragmente erlauben sollte. Diese sollten dann subcloniert und anschließend charakterisiert werden. Als hierfür geeignet erwies sich das Enzym Eco RV. Nach Restriktion mit diesem Enzym wurden stöchiometrische Restriktionsfragmente der Phagen DNA erhalten. In Abb. 17 ist das Spaltmuster der Phagen DNA nach Trennung der Fragmente in einem 0,7%igen Agarosegel sowie die Hybridisierung der Fragmente mit den tubulinspezifischen Proben dargestellt. Demnach enthält der Clon $\lambda\alpha$ 43 ein α - tubulinspezifisches Eco RV - Fragment der Größe 5,5 kb (α 43 - 1). $\lambda\beta$ 40 enthielt zwei β - tubulinspezifische Fragmente mit 3.6 bzw. 2.45 kb (β 40 - 1 und β 40 - 2). Die Restriktionsfragmente α 43 - 1 und β 40 - 2 stimmten in der Größe mit Fragmenten der Vektor - DNA überein. Positive Hybridisierungssignale wurden jedoch nur mit den Fragmenten der rekombinanten Phagen DNA erhalten.

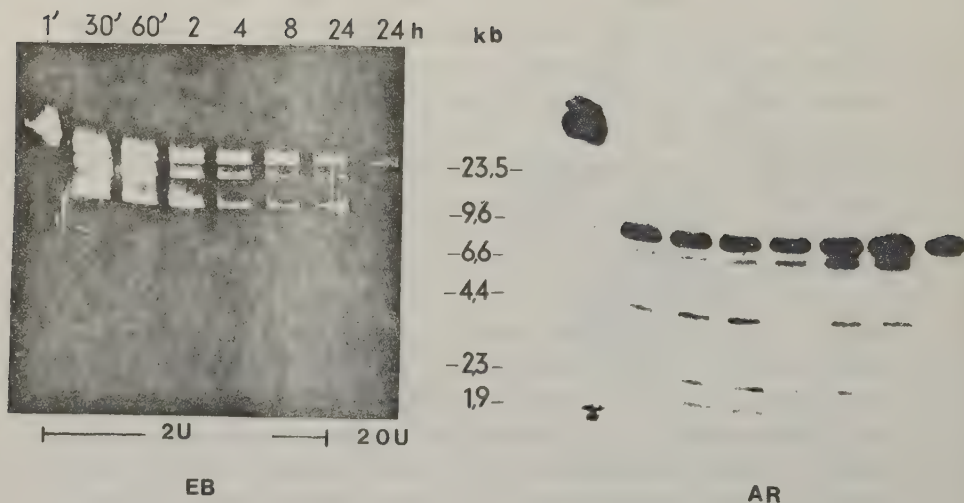


Abb.16 Bam H1 - Restriktion des Phagen λ 43. Je 2 μ g der Phagen DNA wurden mit 2 bzw. 20 Einheiten des Enzyms für die angegebene Dauer inkubiert und anschließend in einem 0,7%igen Agarosegel analysiert. Die DNA wurde auf Nitrocellulose transferiert und mit dem α - tubulinspezifischen Plasmidinsert aus pPca 125 hybridisiert. Dargestellt sind das Ethidiumbromid - gefärbte Gel und das Autoradiogramm der Hybridisierung.

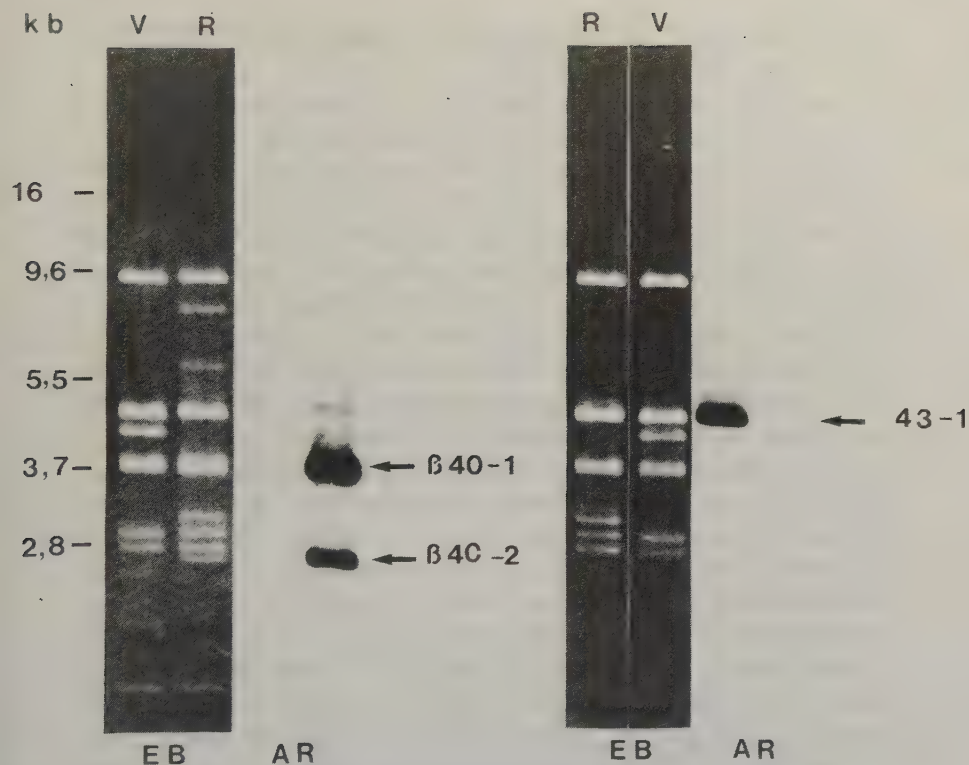


Abb.17 Charakterisierung tubulinspezifischer DNA - Fragmente der Clone $\lambda\beta 40$ und $\lambda\alpha 43$. Je Zug der Phagen DNA wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnitten, in einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (EB). Anschließend wurde die DNA auf Nitrocellulose transferiert und mit den radioaktiven Plasmidinseerten des β - tubulinspezifischen pT₂ bzw. des α - tubulinspezifischen pP α 125 cDNA - Plasmids hybridisiert, gewaschen und autoradiographiert.

4.4.4 Subclonierung und Charakterisierung des Fragments β 40 - 2

Das 2.45 kb große β - tubulinspezifische Fragment aus $\lambda\beta$ 40 wurde isoliert, in die Eco RV Schnittstelle des Vektors pBR 322 inseriert und zur Transformation von *E. Coli* DH1 verwendet. Tetracyclinsensitive Transformanden wurden selektiert. Aus den derart isolierten Kolonien wurde Plasmid DNA präpariert, mit Eco RV geschnitten und in 1%igen Agarosegelen analysiert. Nach Hybridisierung der DNA - Fragmente gegen das β - tubulinspezifische Plasmidinsert aus pT₂ wurde eine Kolonie mit einem tubulinspezifischen 2,45 kb DNA - Insert isoliert. Dieser Subclon des Phagen - DNA Fragmentes β 40 - 2 wurde pPH β 40 - 2 benannt.

Zur Charakterisierung des Plasmides wurden Restriktionsanalysen mit verschiedenen Enzymen durchgeführt, die die Vektor DNA nicht bzw. nur an einer Stelle spalten. Restriktionsfragmente aus Einfach - und Doppelrestriktionen mit verschiedenen Enzymkombinationen wurden zur Molekulargewichtsbestimmung in 1 und 2%igen Agarosegelen aufgetrennt (siehe Tabelle 4). Aus den in Tabelle 4 angegebenen Daten wurde die in Abb. 18 dargestellte Restriktionskarte erstellt. Die Hybridisierung der Spaltprodukte gegen die heterologe β - tubulinspezifische Probe führten zeigten die spezifische Hybridisierung an das 700bp lange Eco RV / Ava 1 Fragment des pPH β 40 - 2 Inserts (Abb. 16).

<u>AvaI</u>	<u>AvaI/PvuII</u>	<u>PvuII</u>	<u>PvuII/PstI</u>
3800 X	3200 X	2750	2750
2240	2240	3700 X	2140 X
540	640	-----	1550
260	370	6450	----
----	260		6440
6840	250		

	6890		

<u>StuI/PstI</u>	<u>StuI/BamHI</u>	<u>KpnI/PstI</u>	<u>KpnI/BamHI</u>
930 X	2510 X	2990 X	350
5700 X	4160	3530	6000 X
----	----	----	----
6630	6670	6520	6350

Tab.3 Restriktionsfragmente des Plasmids pPH β 40 - 2. Plasmid DNA wurde mit den angegebenen Enzymen geschnitten, zur Ermittlung der Größe der Restriktionsfragmente in 1 und 2%igen Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Anschließend wurden die Restriktionsfragmente auf Nitrocellulose transferiert und gegen das β - tubulinspezifische Insert des Plasmids pT₂ hybridisiert. Die Fragmente, die in der Hybridisierung positive Signale ergaben, sind in der Tabelle mit X markiert.

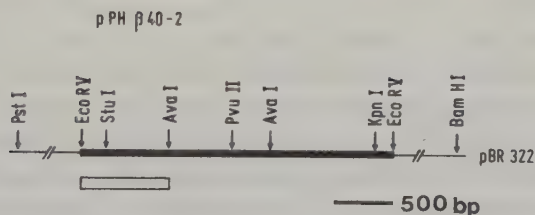


Abb.18 Restriktionskarte des β - tubulinspezifischen Inserts aus pPH β 40 - 2. Plasmid DNA wurde mit den angegebenen Enzymen geschnitten, die Größe der Restriktionsfragmente gelelektrophoretisch bestimmt. Der Teil des Inserts, der spezifisch mit der β - tubulinspezifischen Probe hybridisiert (siehe Tab.3), ist in der Abbildung durch den Balken markiert.

5. DISKUSSION

5.1 Identifizierung von Aktin

Für die Identifizierung in vivo markierten und in vitro translatierten Aktins wurde seine hochspezifische Bindung an DNase 1 genutzt (Zechel, 1980). Neben Aktin ist in *Physarum* nur ein weiteres DNase 1 - bindendes Protein, das Aktin capping Protein cap 42b, bekannt (Maruta & Isenberg, 1983; Maruta & Isenberg, 1984). Seine Konzentration in Gesamtzellextrakten ist jedoch 50fach niedriger als die von Aktin. Dies machte die Annahme wahrscheinlich, daß es sich bei den beobachteten drei Varianten des 42kD Proteins um Aktinisoformen handelt. Diese Annahme wird durch Befunde anderer Autoren erhärtet, die die Existenz von Aktinvarianten in *Physarum* beschreiben und deren identische Aminosäurezusammensetzung zeigen (Pahlic, 1985).

Die Aktinsynthese wird in sporulierenden *Physarum* Plasmodien inhibiert. Diese Hemmung erfolgt zu einem Zeitpunkt an dem die Plasmaströmung der Plasmodien stoppt und die Sporangienmorphogenese beginnt. Die Befunde deuten darauf hin, daß die Fruchtkörperbildung ohne die Beteiligung von Aktomyosinfibrillen abläuft.

5.2 Kernisolierung und in vitro Transkription

In der vorliegenden Arbeit wird ein nukleäres Transkriptionssystem zum Studium Polymerase 2 - abhängiger Gene vorgestellt. Voraussetzung für die Etablierung dieses Systems war die Isolation intakter, transkriptionsaktiver Kerne. Die cytofluorimetrische Analyse der Kernpräparate

zeigte, daß mit der gewählten Methode homogene Kernpopulationen isoliert werden. Die Analyse der Transkriptionsaktivität belegte die Existenz nukleärer Nukleotidpools und eine hohe Aktivität der Kerne über lange Inkubationszeiten (bis 60 min). Dieser Befund deutet möglicherweise auf die Fähigkeit des Systems zur Reinitiation in vitro hin. Das beschriebene Kernsystem zeigt somit entscheidende Vorteile gegenüber einem anderen nukleären Transkriptionssystem aus *Physarum* (Davies & Walker, 1977). Hier wurde Aktivität der Kerne nur nach Zusatz exogener Nukleotide und nur für kurze Inkubationszeiten (10 bis 15 min) erhalten. Der wesentliche Unterschied der Systeme besteht in der Methode der Kernpräparation, die bislang mittels Zentrifugation durch ein 1M Sucrosekissen durchgeführt wurde.

Das vorgestellte Kernsystem wurde zur Analyse der Transkriptionsaktivität der Aktin- und Tubulingene während der Differenzierung verwendet. Dabei schien die Annahme, daß die Aktivitätscharakteristika der Kerne während der Isolationsprozedur erhalten bleiben, gerechtfertigt, da die beobachteten differenzierungsabhängigen Änderungen der Polymerase 2 - Aktivität in isolierten Kernen in Korrelation mit dem Auftreten sporulationsspezifischer mRNA - Spezies in vivo standen. Eine weitere Voraussetzung für das Studium spezifischer Transkription, die Synthese hochmolekularer Transkripte in vitro, schien erfüllt, da die isolierte RNA eine Länge bis etwa 4kb besaß.

Zur Messung der spezifischen Transkripte wurden dot - blot Hybridisierungen gegen homologe und heterologe Hybridisierungsproben verwendet. Diese Methode erwies sich als geeignet für die Bestimmung deutlicher Unterschiede in der Transkription distinkter Gene, wie z.B. die α - Amanitinsensitivität der Aktintranskription, sowie zur Quantifizierung abundanter Transkripte. Die Untersuchungen zur Transkription der Tubulingene zeigen jedoch deutlich die Grenzen des dot - blot Verfahrens (siehe 5.3.2.), da hierzu eine exakte Quantifizierung der relativen Transkriptionsrate auch bei schwachen Signalen erforderlich ist. Eine Voraussetzung

hierfür wäre die quantitative Bindung der Transkripte an die entsprechende Hybridisierungsprobe. Diese konnte bei der gewählten Hybridisierung an filtergebundene DNA - Sequenzen nicht erzielt werden (siehe 4.1.5). Ein besserer methodischer Ansatz hierfür wäre z.B. die Hybridisierung der Transkripte in Lösung gegen einzelsträngige spezifische DNA - Proben. Nach S_1 - Verdau der nichthybridisierenden einzelsträngigen RNA konnten die spezifisch geschützten Transkripte nach gelelektrophoretischer Trennung nachgewiesen werden. Zu Beginn dieser Arbeit standen die hierzu erforderlichen Hybridisierungsproben nicht zur Verfügung. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Clonierung der *Physarum* Tubulingene begonnen.

5.3 Regulation der Aktin und Tubulin mRNA

5.3.1 Aktin

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß die Aktinsynthese während der Sporulation von *Physarum* Plasmodien inhibiert wird und daß diese Hemmung mit dem fast vollständigen Verlust der 1,6kb Aktin mRNA korreliert. Transkriptionsstudien an isolierten Kernen belegen eine kontinuierliche Transkription aktinspezifischer Sequenzen während des Differenzierungsprozesses und deuten auf eine Regulation der Aktinsynthese auf Ebene des RNA - Abbaus hin.

Zur Quantifizierung der Aktin mRNA wurden Northern - blot Hybridisierungen der RNA gegen heterologe Aktine aus *Drosophila* und Hefe durchgeführt. Die Eignung dieser Proben für das Studium von *Physarum* Aktinsequenzen war in früheren Arbeiten gezeigt worden (Schedl & Dove, 1982). Die Größe der *Physarum* Aktin mRNA gleicht mit 1,6kb den in anderen Organismen, wie z. B. *Drosophila* (Fyrberg et al., 1983), *Dictyostelium* (Mc Keown et al., 1978) und Seeigel (Merlino et al., 1981) beobachteten Größen zwischen 1,2 und 2,3kb. Aussagen über die mögliche Existenz verschiedener mRNA -

Spezies gleichen Molekulargewichts waren mit den zur Verfügung stehenden heterologen Hybridisierungsproben nicht möglich.

Zum Studium der Regulation der Aktin mRNA - Synthese wurden Transkriptionsstudien an isolierten Kernen durchgeführt. Diese zeigen eine kontinuierliche Transkription aktinspezifischer Sequenzen während des gesamten Differenzierungsprozesses. Eine genauere Bestimmung relativer Transkriptionsraten ist mit der verwendeten Methodik nicht möglich (siehe 5.2.). Die Ergebnisse deuten jedoch eine mögliche transiente Erniedrigung der Aktintranskription während der Morphogenese (12h p.i.) an. Zu diesem Zeitpunkt ist in Northern - blot Hybridisierungen keine 1,6kb mRNA mehr nachweisbar. Zu einem späteren Zeitpunkt der Morphogenese (15h p.i.) wurde jedoch wieder ein starkes Signal für die Aktintranskription erhalten. Dieser Befund korreliert mit der Beobachtung, daß in reifen Sporen wieder translatierbare Aktin mRNA nachweisbar ist (Abb.11, Putzer et al., 1984).

Eine Inhibition der Aktinsynthese wurde auch bei der cAMP - induzierten Sporulation von *Dictyostelium* (Alton & Lodish, 1977) und bei der Differenzierung von *Naegleria* (Sussman et al., 1984) beobachtet, doch beschränkt sich die Kenntnis der zugrundeliegenden Regulationsmechanismen auf den Nachweis des Verlustes translatierbarer mRNA - Sequenzen. Mechanismen der Aktinregulation wie der oben für *Physarum* vorgeschlagene sind aus anderen Systemen bislang nicht bekannt.

5.3.2 Tubulin

Die Untersuchungen zur Tubulinregulation beschränkten sich auf die Analyse α - tubulinspezifischer Transkripte. hierfür stand eine homologe cDNA zur Verfügung, deren Spezifität für α - Tubulin gezeigt worden war (Schedl et al., 1984). Die verfügbare heterologe β - tubulinspezifische cDNA aus Hühnerhirn erwies sich dagegen aufgrund von Kreuzreaktionen mit α - Tubulinsequenzen als ungeeignet für Northern - blot Analysen und Transkriptionsexperimente. Die Untersuchung der α - Tubulin Synthese ergab während der

Sporulation zwei Maxima der Konzentration der 1,9kb α - Tubulin mRNA. Die beobachtete Induktion der mRNA in Plasmodien 11 Stunden nach Belichtungsbeginn erfolgte zu einem Zeitpunkt, an dem von anderen Autoren eine Präsporangienmitose postuliert worden war (Sauer et al. 1969). Eine mögliche Funktion der Tubuline wäre dann die Ausbildung des mitotischen Spindelapparates. Die Akkumulation von Tubulin mRNA kurz vor der Mitose im Zellcyclus konnte von anderen Autoren gezeigt werden (Schedl et al., 1984). Von diesen Autoren wurde ebenfalls eine leichte Verringerung des Molekulargewichtes der Tubulin mRNA beschrieben. Ein direkter Nachweis der postulierten Präsporangienmitose und einer anschließenden S - Phase steht jedoch noch aus. Das zweite Maximum der α - Tubulin mRNA liegt am Endpunkt der morphologischen Differenzierung (17h p.i.) und reflektiert möglicherweise die Akkumulation von mRNA - Sequenzen während der Sporangienreifung, die für die spätere Keimung von Bedeutung sind.

Transkriptionsstudien zur Synthese tubulinspezifischer Sequenzen wurden mit der α - Tubulin cDNA und zwei unvollständig charakterisierten, β - tubulinverwandten homologen genomischen DNA - Fragmenten durchgeführt. Diese aus einer EMBL 4 Genbank isolierten Sequenzen (β 40 - 1, β 40 - 2) sind bislang nur durch spezifische Hybridisierung an die heterologe β - Tubulin cDNA aus Hühnerhirn charakterisiert (siehe 4.3.3.). direkte Evidenzen für die Identität der DNA fehlen jedoch (siehe 5.4). Die Untersuchung der Tubulintranskription während der Sporulation ergab eine nachweisbare Transkriptionsaktivität in Kernen nicht induzierter und induzierter Plasmodien 15h nach Belichtungsbeginn, eine erhöhte Synthese zum Zeitpunkt der vermuteten Mitose (etwa 12h p.i.) wurde nicht beobachtet. Die erhöhte Transkriptionsaktivität 15h p.i. steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Akkumulation der Tubulin mRNA in Sporen. Parallel durchgeführte Untersuchungen zur Tubulintranskription im Zellcyclus zeigten allerdings eine eindeutige Korrelation zwischen der Transkriptionsrate und

der zellulären Konzentration der 1,9kb α - Tubulin mRNA. Diese Daten lassen folgende Möglichkeiten der Tubulinregulation offen: (1) Tubulinsequenzen werden kontinuierlich mit niedriger Transkriptionsrate synthetisiert, die an der Nachweisgrenze der verwendeten Methodik liegt: die Regulation der Tubulinsynthese erfolgt auf posttranskriptioneller Ebene. (2) Eine stimulierte Tubulintranskription erfolgt in nur einem eng begrenzten Zeitraum der durch die Kernpräparation nicht erfasst wurde. Eine Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten setzt die Etablierung sensitiverer Nachweismethoden für die in vitro Transkripte und eine genauere zeitliche Analyse differentieller Transkriptionsraten voraus.

Eine weitere Untersuchung der Tubulinregulation in diesem System scheint trotz der erforderlichen methodischen Vorarbeiten sinnvoll, da die eindeutig definierte Funktion der Proteine und die exakt beschriebene Induktion der mRNA im Zellcyclus sowie in der Sporulation die Möglichkeit eröffnen, die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen an definiertem, hochsynchronem biologischem Material zu studieren. Eine Transkriptionskontrolle der Tubulinsynthese konnte für *Chlamydomonas* belegt werden: hier induziert die Deflagellation der Zellen die Tubulin - und mRNA - Synthese in vivo. eine korrelierende Aktivierung der Tubulingentranskription konnte an isolierten Kernen gezeigt werden (Keller et al., 1984).

5.4 Clonierung genomischer Tubulinsequenzen aus *Physarum*

Ziel der Clonierungsarbeiten war die Isolierung von Tubulingenen für spätere Untersuchungen zu ihrer Transkription und Struktur. Die Konstruktion der Genbank in dem Phagenvektor EMBL 4 ermöglicht die Clonierung großer DNA - Fragmente (12 - 20kb) und sollte daher die Isolierung flankierender Sequenzen der Gene erleichtern.

Bei den Clonierungsarbeiten aufgetretene Probleme machten

Abweichungen von etablierten Prozeduren notwendig. So wurde eine bevorzugte *in vitro* Verpackung kleiner *Physarum* DNA - Fragmente beobachtet. ein Effekt der möglicherweise auf ungewöhnlichen Strukturen der DNA (z.B. "fold - back" - Strukturen) beruhen könnte. Ferner war das Wachstum der rekombinanten Phagen sowohl auf dem *spi+* - selektiven Wirtstamm Q359 als auch auf dem nicht - selektiven Stamm Q358 sehr gering. Aus diesem Grunde wurde auf eine Amplifikation der Genbank verzichtet, da das *in vitro* verpackte Material zu 20% aus sehr gut amplifizierbaren Wildtypphagen bestand. Auf diese Weise wurde eine Verdünnung der langsam wachsenden Rekombinanten durch Wildtypphagen vermieden.

Bei der Restriktionsanalyse der isolierten tubulinspezifischen Clone wurde das Auftreten substöchiometrischer DNA - Fragmente beobachtet. Die Reproduzierbarkeit dieser Spaltmuster unter verschiedenen Restriktionsbedingungen und mit Enzymen verschiedener Hersteller sprach gegen die Annahme, daß es sich um Artefakte durch unspezifische Nebenaktivitäten der verwendeten Restriktionsenzyme handelte. Eine mögliche Erklärung für diese Heterogenität der DNA ist der Verlust von DNA - Fragmenten aus den klonierten Sequenzen bei der Amplifizierung in *E. coli* Wirtstämmen. Dieser würde zum Verlust vorhandener Erkennungsstellen der Enzyme führen und damit zur Entstehung von Subpopulationen der Phagen mit unterschiedlichen Spaltmustern. Ein derartiger Verlust spezifischer Sequenzen wurde bei der Clonierung der *Physarum* Aktogene im Phagen EMBL 3 beobachtet (Nader et al., 1985). Eine Maßnahme, die bei weiteren Clonierungsarbeiten mit *Physarum* DNA zur Verringerung der genannten Probleme der Phagenamplifikation und des DNA - Verlustes beitragen könnte, ist die Verwendung von *recBC sbcB* Wirtstämmen (Leach & Stahl, 1983).

Nach der Subclonierung des β - tubulinspezifischen Restriktionsfragments $\beta 40 - 2$ in den Plasmidvektor pBR 322 wurden eindeutige Restriktionsmuster der DNA erhalten, die eine Kartierung ermöglichten. In dem klonierten Fragment

konnte eine Teilsequenz identifiziert werden, die spezifisch mit der heterologen β - tubulinspezifischen cDNA hybridisiert. Eine weitere Charakterisierung dieser Sequenz erfordert neben der Hybridselektion der β - Tubulin mRNA vor allem die Sequenzierung des Fragments. Da Tubuline konservierte Proteine sind, sollte der Vergleich mit bekannten Tubulingensequenzen eine eindeutige Identifizierung des klonierten Materials erlauben. Die molekulare Struktur der *Physarum* Tubuline ist von besonderem Interesse, da diesen eine charakteristische Eigenschaft der Tubuline anderer Organismen, die Fähigkeit zur Colchizinbindung, fehlt (Burland et al., 1984).

6. ANHANG

Cytofluorimetrische Untersuchung der isolierten Kerne

Die durchflußcytofluorimetrische Untersuchung der Kernpräparate wurde in Zusammenarbeit mit G. Valet durchgeführt.

Frisch isolierte Kerne wurden mit dem DNA - spezifischen, fluoreszierenden Farbstoff Mithramycin angefärbt und hinsichtlich Partikelgröße und DNA - Gehalt analysiert. Bei der Analyse von Kernen aus wachsenden Plasmodien konnten drei Hauptpopulationen (a, b und c) (Tab. 4, Abb. 19A) mit einem relativen DNA - Gehalt pro Kern von A:B:C wie 1:2:4 unterschieden werden. Die Existenz klar definierter Kernpopulationen und die Abwesenheit von Degradationsprodukten belegte die Eignung der Isolationsmethode. Für das Auftreten unterschiedlicher Kernpopulationen sind zwei Erklärungen möglich: Es könnte sich um Kerne handeln, die sich in unterschiedlichen Phasen des Zellcyclus befinden, oder um Kerne unterschiedlicher Ploidie.

Der Nachweis unterschiedlicher Ploidie der Kernpopulationen setzt die Bestimmung des DNA - Gehaltes eines haploiden Chromosomensatzes (1N) voraus. Um diesen zu ermitteln, wurden Zellen für drei Zellcyclusperioden mit FdUR, einem Hemmstoff der DNA - Synthese (Oertel, 1984) behandelt, um Kerne zu Beginn der S - Phase zu arretieren. Die cytofluorimetrische Analyse dieser Präparate zeigte das Auftreten einer neuen Kernpopulation mit , im Vergleich zu Kernpopulation a, halbiertem DNA - Gehalt und eine Verringerung des Anteils der Population b (Abb. 19B). Ein übereinstimmendes Ergebnis wurde auch nach Analyse der Kerne erhalten, die aus Plasmodien 30 min nach Mitose (frühe S - Phase) isoliert worden waren. Anhand der FdUR - induzierten in G₁ arretierten Kernfraktion konnten nun die beobachteten Kernpopulationen a, b und c als haploide, diploide bzw.

tetraploide Kerne in der G_2 - Phase identifiziert werden.

Zellstadium	Kernpopulationen (% Anteil)			
	(1N)	a(2N)	b(4N)	c(8N)
wachsendes Plasmodium		58,1	37,2	4,57
nach Inkubation für 24 h				
mit 5 ug/ml FdUR	31,4	39,2	23,9	9,43
hungerndes Plasmodium		91,8	7,36	0,80

Tab.4 Kernpopulationen in *Physarum* - Plasmodien

Aus den angegebenen Zellstadien wurden Kerne isoliert, mit Mithramycin angefärbt und cytofluorimetrisch analysiert.

Die Analyse der Kerne aus hungernden Plasmodien zeigte eine spezifische Eliminierung der polyploiden G_2 Kerne (Populationen b und c, Abb. 19C). Dieser Effekt, der vermutlich auf eine selektive Degradation der polyploiden Kerne zurückzuführen ist, bewirkte im Verlaufe der Hungerperiode eine Erhöhung des Anteiles der haploiden Kerne auf schließlich 92% (Tab. 1). Dieser Anteil blieb im Verlauf der Sporulation unverändert (Abb. 19D).

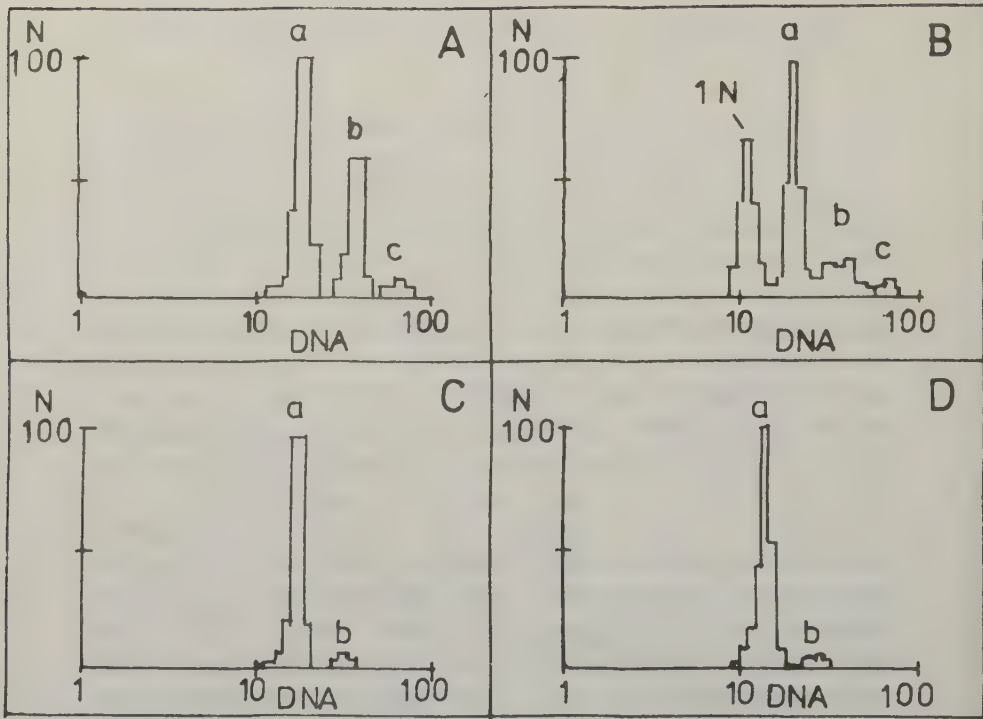


Abb.19 Cytofluorimetrische Untersuchung von Kernpräparaten. Zellkerne wurden mit Mithramycin gefärbt und im Durchflußcytofluorimeter analysiert. In den Diagrammen aufgetragen ist die Häufigkeit (N) der Partikel gegen die Fluoreszenzintensität (relativer DNA - Gehalt). Die Kernisolation erfolgte aus (A) wachsenden Makroplasmodien, (B) mit FUDR vergifteten, wachsenden Makroplasmodien, (C) hungernden und (D) sporulierenden Plasmodien.

7. LITERATUR

- Alton. T.A. & Lodish, H.F. (1977) Dev. Biol. 60, 180 - 206
- Apel, K. (1979) Eur. J. Biochem. 97, 183 - 188
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) Nucleic Acids Res. 7, 1513 - 1517
- Burland, T.G., Schedl, T. Gull, K. & Dove W.F. (1984) Genetics 108. 123 - 141
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. & Rutter, W.J. (1979) Biochemistry 18, 5294 - 5299
- Cleveland, D.W. (1983) Cell 34, 330 - 332
- Cleveland, D.W., Lopata, M.A., Mac Donald, R.J., Cowan, N.J., Rutter, W.J. & Kirschner, M.W. (1980) Cell 20, 95 - 106
- Cook, K.S., Hunt, C.R. & Spiegelman B.M. (1985) J. Cell Biol. 100, 514 - 520
- Cooke, D.J. & Dee, J. (1975) Genet. Res. (Camb.) 2, 175 - 187
- Daniel, J.W. & Baldwin, H.H. (1964) in Methods in Cell Physiology. ed. Prescott, D.M. (Academic, New York) Vol.1, 9 - 41
- Davies, K. & Walker, I.O. (1978) FEBS letters 2, 303 - 306

- Ernst, D. & Oesterhelt, D. (1984) *EMBO J.* 3, 3075 - 3078
- Faulstich, H. (1980) The Amatoxins. in: F.E. Hahn (ed): *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Vol.7. 88 - 134, Springer Verlag Berlin
- Ferris, P.J. & Vogt, V.M. (1982) *J. Mol. Biol.* 159, 359 - 381
- Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. & Tsugita, A. (1961) *Virology* 14, 54 - 58
- Fyrberg, E.A., Mahaffey, J.W., Bord, B.J. & Davidson, N., (1983) *Cell* 31, 375 - 382
- Gressel, J. (1980) in: Senger, H. (ed.) *The Blue Light Syndrome*, Springer Verlag, pp 133 - 155
- Gurdon, J.B., Brennan, S., Fairman, S. & Mohun, T.J. (1984) *Cell* 38, 691 - 700
- Guttes, E., Guttes, S. & Rusch, H.P. (1969) *Dev. Biol.* 3, 588 - 614
- Hatano, S., Owaribe, K., Matsumura, F., Hasegawa, T. & Takahashi, S. (1980) *Can. J. Bot.* 58, 750 - 759
- Havercroft, J. & Gull, K. (1983) *Eur. J. Cell Biol.* 3, 67 - 74
- Ishigami, M., Nagai, R. & Kuroda, K. (1981) *Protoplasma* 109, 91 - 102
- Kalfayan, L. & Wensink, P.C. (1981) *Cell* 24, 97 - 10
- Karn, J., Brenner, S. & Barnett, L. (1983) *Meth. Enzymol.* 101, 3 - 19

Keller, L.R., Schloss, J.A., Silflow, C.D. & Rosenbaum, J.L.
(1984) J. Cell Biol. 98, 1138 - 1143

Korn, E.D. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 588 - 599

Korn, E.D. (1982) Physiological Rev. 62, 672 - 737

Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680 - 685

Laffler, T.G., Chang, M.T. & Dove, W.D. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5000 - 5004

Laskey, R.A. & Mills, A.D. (1977) FEBS letters 82, 314 - 316

Leach, D.R.F. & Stahl, F.W. (1983) Nature 305, 448 - 451

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. & Boedtke, H. (1977) Biochemistry 16, 4743 - 4750

Maniatis, T., Jeffrey, A. & Kleid, D.G. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1184 - 1186

Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory

Maruta, H. & Isenberg, G. (1983) J. Biol. Chem. 258, 10151 - 10158

Maruta, H. & Isenberg, G. (1984) J. Biol. Chem. 259, 5208 - 5213

McKeown, M., Taylor, W.C., Kindle, K.L., Firtel, R.A., Bender, W. & Davidson, N. (1978) Cell 14, 789 - 800

Melera, P., Peltz, R., Davide, J.P. & O'Connell, M. (1978) Molec. Biol. Rep. Vol. 4, 4, 229 - 232

- Merlino, G.T., Water, R.D., Moore, G.P. & Kleinsmith, L.J.
(1981) Dev. Biol. 85, 505 - 508
- Mischke, D. & Pardue, M.L. (1982) J. Mol. Biol. 156, 449 - 466
- Nader, W., Edlind, Th.D., Hüttermann, A. & Sauer, H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press
- Naib - Majani, W., Stockem, W. Wohlfahrt - Bottermann K.E., Osborn, M. & Weber, K. (1982) Eur. J. Cell Biol. 28, 103 - 114
- Ng, R. & Abelson, J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3912 - 3916
- Oertel, W. (1984) Mol. Gen. Genet. 196, 323 - 331
- Pahlic, M. (1985) Eur. J. Cell Biol. 3, 169 - 175
- Palatnik, C.M., Storti, R.V. & Jacobson, A. (1979) J. Mol. Biol. 128, 371 - 395
- Parker, C. & Topol, J. (1984) Cell 36, 357 - 369
- Perlman, A.J., Wolffe, A.P., Champion, J. & Tata, J.R. (1984) Mol. Cell. Endocrinol. 38, 151 - 161
- Pollard, T.D. & Weihing, R.R. (1974) CRC Crit. Rev. Biochem. 2, 1 - 65
- Putzer, H., Verfuert, Claviez, M. & Schreckenbach, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7117 - 7121
- Raff, E.C., Fuller, M.T., Kaufman, T.C., Kempfues, K.J., Rudolph, J.E. & Raff, R.A. (1982) Cell 28, 33 - 40

Roberts, K. & Hyams, J.S. (eds) (1979) in: Microtubuli, Academic Press, London / New York

Sanchez, F., Tobin, S.L., Rdest, U., Zulauf, E. & MacCarthy, B. (1983) J. Mol. Biol. 163, 533 - 551

Sauer, H.W., Babcock, K.L. & Rusch, H.P. (1969) Exp. Cell Res. 57, 319 - 327

Schedl, T., Burland, T.G., Gull, K. & Dove, W.D. (1984) J. Cell.Biol. 99, 155 - 165

Schedl, T. & Dove, W.F. (1982) J. Mol. Biol. 160, 41 - 57

Schedl, T., Owens, J., Dove, W.F. & Burland, T.G. (1984) Genetics 108, 143 - 164

Southern, E.M. (1975) J. Mol. Biol. 98, 503 - 517

Sussman, D.J., Lai, E.Y. & Fulton, C. (1984) J. Biol. Chem. 259, 7355 - 7360

Tata, J.R., Tharappel, C.J., Watson, C.S., Williams, J.L. & Wolffe, A.P. (1983) in: Biology of Egg Maturation. Pitman Books London. 96 - 110

Thomas, P.S. (1983) Meth. Enzymol. 100, 255 - 266

Tobin, E.M. (1981) Plant Mol. Biol. 1, 35 - 51

Tobin, S.L., Zulauf, E., Sanchez, F., Craig, E.A. & McCarthy, B.J. (1980) Cell 19, 121 - 131

Tsang, A.S., Mahubani, H. & Williams, J.G., (1982) Cell 31, 375 - 382

Vandekerckhove, J. & Weber, K. (1978) Nature 276, 720 - 721

Valenzuela, P., Quiroga, M., Zaldivar, J., Rutter, W.J.,
Kirschner, M.W. & Cleveland, D. (1981) *Nature* 289, 650 - 655

Werenskiold, A.K., (1982) Diplomarbeit, Universität München

Wohlfahrt - Bottermann, K.E. (1979) *J. Exp. Biol.* 81, 15 -
32

Young, R.A. & Davis, R.W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,
1194 - 1198

Young, R.A. & Davis, R.W. (1983b) *Science* 222, 787 - 782

Zechel, K. (1980) *Eur. J. Biochem.* 110, 343 - 348

8. ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(amino- ethylether)-N,N' tetraessigsäure
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1- ethylsulfonsäure
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
mi	Minuten
mRNA	messenger RNA
PIPES	Piperazin-1,4-bis-2-ethansulfonsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Lebenslauf

Name	Anne Katrin Werenskiold
geboren	16.7.1958
Eltern	Jens Andreas Werenskiold Henny Werenskiold
Staatsangehörigkeit	norwegisch
Schulbildung	3 Jahre Grundschule 8 Jahre mathematisch - naturwissen - schaftliches Gymnasium
Studium	Biologie / Diplom 4 Semester Universität Würzburg 5 Semester Universität München
Diplomarbeit	Max Planck Institut für Biochemie Thema : Zum Einfluss von Licht auf die Proteinsynthese bei Physarum polycephalum

